

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091721 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.11.27

(22) Дата подачи заявки
2019.01.15

(51) Int. Cl. C12N 15/52 (2006.01)
C12N 5/04 (2006.01)
A01H 5/00 (2018.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01)

(54) РАСТЕНИЯ С ПОВЫШЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГЕРБИЦИДАМ

(31) 18152064.4

(32) 2018.01.17

(33) EP

(86) PCT/IB2019/050310

(87) WO 2019/142099 2019.07.25

(71) Заявитель:
БАСФ SE (DE)

(72) Изобретатель:

Шахтшабель Дорен, Холленбах Ева,
Зизай Михирет Текесте, Цирке Томас,
Геердинк Данни (DE)

(74) Представитель:

Беляева Е.Н. (BY)

(57) Настоящее изобретение относится к растению или части растения, включающим полинуклеотид, кодирующий полипептид мутированной TrtA, при этом экспрессия указанного полинуклеотида придает растению или части растения устойчивость к гербицидам.

A1

202091721

202091721

A1

РАСТЕНИЯ С ПОВЫШЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГЕРБИЦИДАМ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится в целом к способам, позволяющим повысить устойчивость сельскохозяйственных культур к гербицидам. В частности, изобретение относится к растениям с повышенной устойчивостью к гербицидам, более конкретно к гербицидам-ингибиторам биосинтеза целлюлозы, которые таким образом препятствуют биосинтезу клеточной оболочки.

ПРЕДПОСЫЛКИ К СОЗДАНИЮ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Микроорганизмы зачастую реагируют на введение ксенобиотиков в среду за счет развития механизмов их использования в качестве источника питательных веществ и энергии для их роста. Поскольку структура гербицидов, которая основана на s-триазиновом кольце, отличается от природных соединений (Esser et al. 1975), микроорганизмы медленно выработали ферменты и метаболические пути для их распада. Суперсемейство амидогидролазы включает поразительный набор ферментов, которые катализируют гидролиз большого количества субстратов, содержащих функциональные группы амидов или сложных эфиров в углеродных и фосфорных центрах. Во всех случаях нуклеофильная молекула воды активируется за счет комплексообразования с одноядерным или двухядерным центром металла. В моноядерных центрах металла субстрат активируется протонным переносом из активного участка, а вода активируется лигированием металла и общим основным катализом. Центры металла осаждаются на С-концевой области сердцевины бета-бочки в пределах (бета альфа) 8-го структурного домена. Одним из ярких примеров является атразинхлоргидролаза (AtzA), зависящий от Fe(II) гомогексамер (Seffernick et al. 2002; Wackett et al. 2002a), который является катализатором гидролитического дехлорирования атразина, гербицида, из которого получают негербицидный продукт 2-гидроксиатразин (de Souza et al. 1996; Seffernick et al. 2002; Sadowsky and Wackett 2000). Наиболее близкой к AtzA родственной формой из известных является меламинадиаминаза (TriA из *Pseudomonas* sp. штамм NRRL B-12227; 98% идентичности последовательности). Несмотря на высокую степень идентичности последовательности AtzA и TriA отличаются по своим каталитическим свойствам. TriA – это диаминаза с активностью дехлориназы на

несколько порядков ниже ее физиологической активности диаминазы, тогда как AtzA – это дехлориназа без заметной активности диаминазы. Предыдущие исследования показали, что три из девяти аминокислот, которые отличаются двумя белками (S331C; N328D; и F84I AtzA), в значительной степени отвечают за различия в возникновении специфических каталитических свойств.

Настоящее изобретение предоставляет новые способы повышения устойчивости растений к гербицидам за счет введения бактериальных генов, кодирующих белки-мишени, которые разлагают гербицид биологическим способом, в частности, ингибиторы биосинтеза целлюлозы, которые известны как азины. Бактериальный фермент TgIA был разработан в такой форме, чтобы сохранить или увеличить активность амидогидролазы и расширить ферментный карман для принятия более объемистого субстрата. Авторами настоящего изобретения было неожиданно обнаружено, что сверхэкспрессия дикого типа или мутантных форм меламинадиаминазы TgIA придает растениям устойчивость/стойкость к определенным классам гербицидов по сравнению с нетрансформированными и/или не мутировавшими растениями или клетками растений, соответственно. В частности, авторами настоящего изобретения было обнаружено, что экспрессия TgIA придает устойчивость/стойкость к азинам.

Задача настоящего изобретения может рассматриваться как получение новых характеристик путем идентификации целевых полипептидов, манипуляции с которыми придает растениям устойчивость к гербицидам.

Существуют три основные стратегии повышения устойчивости растений к гербицидам, а именно: (1) детоксификация гербицида ферментами, которые трансформируют гербицид или его активный метаболит в нетоксичные продукты, такими, как, например, ферменты для повышения устойчивости к бромоксинулу или баста (EP242236, EP337899); (2) мутация целевого фермента в функциональный фермент, который будет менее чувствителен к гербицидам или его активному метаболиту, например, ферменты для повышения устойчивости к глифосату (EP293356, Padgett S. R. et al., J.Biol. Chem., 266, 33, 1991); или (3) сверхэкспрессия чувствительного фермента для получения в растении достаточного количества целевого фермента относительно гербицида с точки зрения кинетических констант этого фермента, чтобы получить достаточное количество функционального фермента, несмотря на присутствие его ингибитора.

Эта проблема решается предметом настоящего изобретения.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Соответственно, согласно одному аспекту настоящим изобретением предоставляется растение или часть растения, содержащие полинуклеотид, кодирующий полипептид мутированной Tg1A, при этом экспрессия указанного полинуклеотида придает растениям или частям растений устойчивость к гербицидам.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящим изобретением предоставляется семя, способное развиваться в растение, содержащее, по меньшей мере, в некоторых своих клетках полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растения, при этом промотор способен экспрессировать полипептид мутированной Tg1A, кодированный указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида мутированной Tg1A придает указанному растению устойчивость к гербицидам.

В соответствии с одним аспектом настоящим изобретением предоставляется клетка растения или клетка, из которой может быть регенерировано растение, которое, по меньшей мере, в некоторых своих клетках содержит полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растения, при этом промотор способен экспрессировать полипептид мутированной Tg1A, кодированный указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида мутированной Tg1A придает указанному растению устойчивость к гербицидам, при этом указанная клетка растения содержит полинуклеотид, функционально связанный с промотором.

В соответствии с еще одним аспектом, настоящим изобретением предоставляется клетка растения, содержащая полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетке, при этом промотор способен экспрессировать полипептид мутированной Tg1A, кодированный указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида мутированной Tg1A придает указанному растению устойчивость к гербицидам.

В соответствии с другими аспектами настоящим изобретением предоставляется растительный продукт, полученный из растения или части растения, которые, по меньшей мере, в некоторых своих клетках содержат

полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растения, при этом промотор способен экспрессировать полипептид мутированной Tg1A, кодированный указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида мутированной Tg1A придает указанному растению устойчивость к гербицидам.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящим изобретением предоставляется потомство или потомки растения, которое, по меньшей мере, в некоторых своих клетках содержит полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растения, при этом промотор способен экспрессировать полипептид мутированной Tg1A, кодированный указанным полинуклеотидом, причем указанное потомство или потомки растения, по меньшей мере, в некоторых своих клетках содержат рекомбинантный полинуклеотид, функционально связанный с промотором, при этом экспрессия полипептида мутированной Tg1A придает указанному потомству или потомкам растения устойчивость к гербицидам.

В соответствии с другими аспектами изобретения настоящим изобретением предоставляется способ борьбы с сорняками в месте произрастания растений, при этом указанный способ включает: (а) внесение гербицидной композиции, содержащей гербициды, в место произрастания растений; и (b) посев семян в указанном месте, при этом семя способно развиваться в растение, содержащее, по меньшей мере, в некоторых своих клетках полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растения, при этом промотор способен экспрессировать полипептид мутированной Tg1A, кодированный указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида мутированной Tg1A придает указанному растению устойчивость к гербицидам.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящим изобретением предоставляется способ борьбы с сорняками в месте произрастания растений, при этом указанный способ включает: внесение гербицидной композиции, содержащей гербициды, в место произрастания растений; при этом на указанном месте: (а) произрастает растение или посажено семя, способное развиваться в указанное растение; или (b) будет произрастать растение или будет посажено такое семя после внесения указанной гербицидной композиции; при этом указанные растение или семя, по меньшей мере, в некоторых своих клетках содержат полинуклеотид,

функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растения, при этом промотор способен экспрессировать полипептид мутированной TrtA, кодированный указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида мутированной TrtA придает указанному растению устойчивость к гербицидам.

В соответствии с одним аспектом этап (a) осуществляется перед этапом (b), после этапа (b) или одновременно с этапом (b).

В соответствии с другими аспектами настоящим изобретением предоставляется способ получения растения с устойчивостью к гербицидам, при этом указанный способ включает регенерирование растения из клетки растения, трансформированной с использованием полинуклеотида, функционально связанного с промотором, функционирующим в клетке, при этом промотор способен экспрессировать полипептид мутированной TrtA, кодированный указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида мутированной TrtA придает указанному растению устойчивость к гербицидам.

В соответствии с одним аспектом настоящим изобретением предоставляется способ получения потомства растения с устойчивостью к гербицидам, при этом указанный способ включает: скрещивание первого растения, обладающего устойчивостью к гербицидам, со вторым растением для получения потомства растения, обладающего устойчивостью к гербицидам, при этом первое растение и потомство растения, по меньшей мере, в некоторых своих клетках содержат полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растения, при этом промотор способен экспрессировать полипептид мутированной TrtA, кодированный указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида мутированной TrtA придает указанному растению устойчивость к гербицидам.

В дополнение, настоящее изобретение относится к способу определения гербицида с использованием TrtA дикого типа или мутированной TrtA по настоящему изобретению, кодированной нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или ее вариант, гомолог, паралог или ортолог.

Данный способ включает следующие этапы:

- a) получение трансгенной клетки или растения, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую мутированную Tg1A, где мутированная Tg1A по настоящему изобретению экспрессирована;
- b) применение гербицида к трансгенной клетке или растению a) и к контрольной клетке или растению того же вида;
- c) определение роста или жизнеспособности трансгенной клетки или растения и контрольной клетки или растения после применения указанного тестового соединения, и
- d) отбор тестовых соединений, которые привели к уменьшению роста контрольной клетки или растения по сравнению с ростом трансгенной клетки или растения.

Другая цель настоящего изобретения относится к способу идентификации нуклеотидной последовательности, кодирующей мутированную Tg1A, которая является стойкой или устойчивой к гербициду. Способ включает следующее:

- a) получение библиотеки нуклеиновых кислот, кодирующих мутированную Tg1A,
- b) скрининг популяции полученных нуклеиновых кислот, кодирующих мутированную Tg1A, путем экспрессии каждой указанной нуклеиновой кислоты в клетке или растении и обработка этой клетки или растения гербицидом,
- c) сравнение уровней устойчивости к гербицидам, которые получены из данной популяции нуклеиновых кислот, кодирующих мутированную Tg1A, с уровнями устойчивости к гербициду, которые получены из контрольной нуклеиновой кислоты, кодирующей Tg1A,
- d) селекция, по меньшей мере, одной нуклеиновой кислоты, кодирующей мутированную Tg1A, которая показывает значительно повышенный уровень устойчивости к гербициду по сравнению с контрольной нуклеиновой кислотой, кодирующей Tg1A.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая мутированную Tg1A и выбранная на этапе d), обеспечивает устойчивость к гербициду выше, по меньшей мере, в два раза по сравнению с устойчивостью контрольной нуклеиновой кислоты, кодирующей Tg1A.

Стойкость или устойчивость может быть определена путем получения трансгенного растения с нуклеотидной последовательностью из библиотеки в соответствии с этапом а) и путем сравнения этого трансгенного растения с контрольным растением.

Еще одна цель изобретения относится к изолированным, полученным рекомбинантным путем и/или химически синтезированным нуклеиновым кислотам, кодирующим TriA дикого типа или мутированную TriA, при этом данная нуклеиновая кислота содержит последовательности SEQ ID NO: 1 или ее вариант, согласно определению в настоящем документе.

Предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к изолированной и/или полученной рекомбинантным путем и/или синтетической молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид с мутированной TriA, выбранной из группы, состоящей из:

- (a) молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид с мутированной TriA и содержащей последовательность SEQ ID NO: 2 или ее вариант, паралог, ортолог или гомолог;
- (b) молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность SEQ ID NO: 1 или ее вариант, паралог, ортолог или гомолог;
- (c) молекулы нуклеиновой кислоты, которая, в результате дегенерации генетического кода может быть получена из последовательности полипептида TriA SEQ ID NO: 2 или ее варианта, паралога, ортолога или гомолога и придает повышенную устойчивость или стойкость к гербицидам по сравнению с соответствующей, например, нетрансформированной, клеткой растения дикого типа, растением или его частью;
- (d) молекулы нуклеиновой кислоты с идентичностью 30% или более, предпочтительно 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более с последовательностью молекулы нуклеиновой кислоты полинуклеотида, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или ее варианта, паралога, ортолога или гомолога, и придает повышенную устойчивость или стойкость к гербицидам по сравнению с соответствующим, например,

нетрансформированной, клеткой растения дикого типа, растением или его частью;

- (е) молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид с мутированной TriA, с идентичностью 30% или более, предпочтительно, по меньшей мере, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более с аминокислотной последовательностью полипептида TriA последовательности SEQ ID NO: 2 и придает повышенную устойчивость или стойкость к гербицидам по сравнению с соответствующей, например, нетрансформированной, клеткой растения дикого типа, растением или его частью;
- (f) молекулы нуклеиновой кислоты, которая гибридизирует с молекулой нуклеиновой кислоты по пунктам (а), (b), (c), (d) или (е) в жестких условиях гибридизации и придает повышенную устойчивость или стойкость к гербицидам по сравнению с соответствующей, например, нетрансформированной, клеткой растения дикого типа, растением или его частью;

причем аминокислотная последовательность полипептида с мутированной TriA отличается от аминокислотной последовательности дикого типа полипептида TriA в одном или более положениях, соответствующих следующим положениям SEQ ID NO: 2: 92, 93, 155, 157.

Еще одна цель изобретения относится к кассете экспрессии, включающей молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, а также промотор, функционирующий в клетках растения.

Предпочтительно, промотор является промотором, специфическим в отношении корня, или промотором, усиленным в отношении корня, из *Glycine max*.

Еще одна цель изобретения относится к изолированному рекомбинантному и/или химически синтезированному полипептиду с мутированной TriA, при этом данный полипептид содержит последовательность SEQ ID NO: 2 или ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог согласно определению в настоящем документе ниже.

Предпочтительно аминокислотная последовательность полипептида с мутированной TrtA отличается от аминокислотной последовательности дикого типа полипептида TrtA в одном или более положениях, соответствующих следующим положениям SEQ ID NO: 2: 92, 93, 155, 157.

В соответствии с другими аспектами настоящим изобретением предоставляется растение или часть растения, которые, по меньшей мере, в некоторых своих клетках содержат полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растения, при этом промотор способен экспрессировать полипептид с мутированной TrtA, кодированный указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида TrtA с мутированной TrtA придает указанному растению устойчивость к гербицидам, при этом растение или часть растения дополнительно проявляют характеристику устойчивости ко второму или третьему гербициду.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к клетке растения, трансформированной нуклеиновой кислотой TrtA дикого типа или нуклеиновой кислотой с мутированной PPO в соответствии с настоящим изобретением или экспрессировавшей такую кислоту, или к растению, которое подвергли мутации для получения растения с экспрессией, предпочтительно со сверхэкспрессией нуклеиновой кислоты TrtA дикого типа или с мутировавшей TrtA в соответствии с настоящим изобретением, причем экспрессия указанной нуклеиновой кислоты в клетке растения приводит к повышению стойкости или устойчивости к гербициду по сравнению с клеткой растения дикого типа.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к растению с клеткой растения в соответствии с настоящим изобретением, в котором экспрессия нуклеиновой кислоты приводит к повышению стойкости растения к гербициду по сравнению с растением дикого типа.

Предпочтительно, экспрессия нуклеиновой кислоты по изобретению в растении приводит к повышению стойкости растения к гербициду по сравнению с растением дикого типа.

В другом варианте осуществления изобретение относится к семени, полученному из трансгенного растения с клеткой растения по настоящему изобретению, в котором семя передает потомству признак повышения стойкости растения к гербициду по сравнению с семенем дикого типа.

В еще одном варианте осуществления изобретения изобретение относится к способу получения клетки трансгенного растения с повышенной стойкостью к гербициду по сравнению с клеткой растения дикого типа, включая трансформирование клетки растения кассетой экспрессии, содержащей полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растения, при этом промотор способен экспрессировать полипептид с мутированной TrtA, кодированный указанным полинуклеотидом.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к способу получения трансгенного растения, включающему: (a) трансформирование клетки растения кассетой экспрессии, содержащей полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растения, при этом промотор способен экспрессировать полипептид с мутированной TrtA, кодированный указанным полинуклеотидом, и (b) получение из растительной клетки растения с повышенной стойкостью к гербициду.

Предпочтительно, кассета экспрессии также включает регулятивный участок инициации транскрипции и регулятивный участок инициации трансляции, которые функционируют в растении.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На Фигуре 1 показана оценка устойчивости соевых растений, обработанных азинами, при гидропонном выращивании. Развитие фенотипа дикого растения (A) и трансгенных объектов, экспрессирующих мутантный вариант TrtA последовательности SEQ ID NO: 2, содержащей аминокислотные замещения в четырех позициях, а именно: L92T_Y93L_M155T_F157L (B, C и D). Указанные значения отражают количество [нМ] 6-циклопентил-N4-(2,3,4,5,6-пентафторфенил)-1,3,5-триазин-2,4-диамина.

На Фигуре 2 показано разложение 6-циклопентил-N4-(2,3,4,5,6-пентафторфенил)-1,3,5-триазин-2,4-диамина TrtA-мутантными полипептидами. Полипептиды использовали непосредственно или после инкубации при комнатной температуре в течение 72 ч. с добавлением или без добавления протеазы.

На Фигуре 3 показано разложение 6-циклопентил-N4-(2,3,4,5,6-пентафторфенил)-1,3,5-триазин-2,4-диамина двумя TrtA-полипептидами с мутациями L92A_Y93L_M155T_F157L (патентная заявка WO 2018/011750) и

L92T_Y93L_M155T_F157L. Полипептиды использовали непосредственно или после инкубации при 30 °С в течение 20 ч. с различными концентрациями добавленной протеазы.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Неопределенные артикли, используемые в настоящем изобретении, относятся к одному или более (т.е., по меньшей мере, одному) существительным, с которыми употребляется артикль. Например, неопределенный артикль со словом «элемент» означает один или более элементов.

Согласно использованию в настоящем изобретении, слово «содержание» или его вариации, такие как «содержит» или «содержащий», подразумевает включение указанного элемента, целого числа или этапа или группы элементов, целых чисел или этапов, но не исключение какого-либо другого элемента, целого числа или этапа или группы элементов, целых чисел или этапов.

Термин «борьба с нежелательной растительностью или сорняками» подразумевает уничтожение сорняков и/или замедление или препятствование их нормальному росту. Под сорняками, в широком смысле, подразумевают все растения, растущие там, где это нежелательно. Термин «сорняки» в соответствии с настоящим изобретением включает, например, двудольные и однодольные сорняки. Двудольные сорняки включают, помимо прочего, сорняки следующих родов: *Sinapis*, *Lepidium*, *Galium*, *Stellaria*, *Matricaria*, *Anthemis*, *Galinsoga*, *Chenopodium*, *Urtica*, *Senecio*, *Amaranthus*, *Portulaca*, *Xanthium*, *Convolvulus*, *Ipomoea*, *Polygonum*, *Sesbania*, *Ambrosia*, *Cirsium*, *Carduus*, *Sonchus*, *Solanum*, *Rorippa*, *Rotala*, *Lindernia*, *Lamium*, *Veronica*, *Abutilon*, *Emex*, *Datura*, *Viola*, *Galeopsis*, *Papaver*, *Centaurea*, *Trifolium*, *Ranunculus*, и *Taraxacum*. Однодольные сорняки включают, помимо прочего, сорняки следующих родов: *Echinochloa*, *Setaria*, *Panicum*, *Digitaria*, *Phleum*, *Poa*, *Festuca*, *Eleusine*, *Brachiaria*, *Lolium*, *Bromus*, *Avena*, *Cyperus*, *Sorghum*, *Agropyron*, *Cynodon*, *Monochoria*, *Fimbristylis*, *Sagittaria*, *Eleocharis*, *Scirpus*, *Paspalum*, *Ischaemum*, *Sphenoclea*, *Dactyloctenium*, *Agrostis*, *Alopecurus* и *Apera*. Кроме того, термин «сорняки» в соответствии с настоящим изобретением может включать, например, сельскохозяйственные культуры, растущие на нежелательном участке. Например, произвольно растущая кукуруза на поле, где главным образом растет соя, может считаться сорняком, если она там нежелательна.

Понятие «растение» используют в широком смысле, так как он подразумевает органический материал и включает эукариотические организмы, принадлежащие царству растений, примеры которых включают, помимо прочего, сосудистые растения, овощи, хлебные злаки, цветы, деревья, травы, кусты, дерн, виноградную лозу, папоротники, мхи, грибы и водоросли и т.д., а также клоны, отростки и части растений, используемые для вегетативного размножения (например, побеги, стебли, побеги, корневища, подземные корни, группы побегов, венчики, луковицы, клубнелуковицы, клубни, растения/ткани, полученные при культивировании ткани и т.д.). Термин «растение» также обозначает целое растение, предков и потомство растений и их части, включая семена, побеги, стебли, листья, корни (включая клубни), цветки, соцветия, плоды, цветоножки, плодоножки, тычинку, пыльник, рыльце, завязь, чашелистик, плодolistик, корневой кончик, корневой чехлик, корневой волосок, листовой волосок, растительное волокно, пыльцевое зерно, микроспоры, семядолю, гипокотиль, эпикотиль, ксилему, флоэму, паренхиму, эндосперму, клетку-спутник, замыкающую клетку и другие известные органы, ткани и клетки растения, и ткани и органы, где каждый из вышеперечисленного содержит интересующий ген/нуклеиновую кислоту. Термин «растение» также включает клетки растений, суспензионные культуры, ткань каллюсов, эмбрионы, меристемные области, гаметофиты, спорофиты, пыльцу и микроспоры, которые содержат целевой ген/нуклеиновую кислоту.

Растения, в частности, применимые в способах настоящего изобретения, включают все растения, которые относятся к подцарству *Viridiplantae*, в частности, однодольные и двудольные растения, включая кормовые растения или кормовые бобовые культуры, декоративные растения, продовольственные культуры, деревья или кустарники, выбранные из перечня, помимо прочего, включающего: *Acer* spp., *Actinidia* spp., *Abelmoschus* spp., *Agave sisalana*, *Agropyron* spp., *Agrostis stolonifera*, *Allium* spp., *Amaranthus* spp., *Ammophila arenaria*, *Ananas comosus*, *Annona* spp., *Apium graveolens*, *Arachis* spp, *Artocarpus* spp., *Asparagus officinalis*, *Avena* spp. (например, *Avena sativa*, *Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua* var. *sativa*, *Avena hybrida*), *Averrhoa carambola*, *Bambusa* sp., *Benincasa hispida*, *Bertholletia excelsa*, *Beta vulgaris*, *Brassica* spp. (например, *Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp. [канола, маслиничный рапс, репа маслиничная]), *Cadaba farinosa*, *Camellia sinensis*, *Canna*

indica, *Cannabis sativa*, *Capsicum* spp., *Carex elata*, *Carica papaya*, *Carissa macrocarpa*,
Carya spp., *Carthamus tinctorius*, *Castanea* spp., *Ceiba pentandra*, *Cichorium endivia*,
Cinnamomum spp., *Citrullus lanatus*, *Citrus* spp., *Cocos* spp., *Coffea* spp., *Colocasia*
esculenta, *Cola* spp., *Corchorus* sp., *Coriandrum sativum*, *Corylus* spp., *Crataegus* spp.,
Crocus sativus, *Cucurbita* spp., *Cucumis* spp., *Cynara* spp., *Daucus carota*, *Desmodium*
spp., *Dimocarpus longan*, *Dioscorea* spp., *Diospyros* spp., *Echinochloa* spp., *Elaeis*
(например, *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*), *Eleusine coracana*, *Eragrostis tef*,
Erianthus sp., *Eriobotrya japonica*, *Eucalyptus* sp., *Eugenia uniflora*, *Fagopyrum* spp.,
Fagus spp., *Festuca arundinacea*, *Ficus carica*, *Fortunella* spp., *Fragaria* spp., *Ginkgo*
biloba, *Glycine* spp. (например, *Glycine max*, *Soja hispida* или *Soja max*), *Gossypium*
hirsutum, *Helianthus* spp. (например, *Helianthus annuus*), *Hemerocallis fulva*, *Hibiscus*
spp., *Hordeum* spp. (например, *Hordeum vulgare*), *Ipomoea batatas*, *Juglans* spp.,
Lactuca sativa, *Lathyrus* spp., *Lens culinaris*, *Linum usitatissimum*, *Litchi chinensis*,
Lotus spp., *Luffa acutangula*, *Lupinus* spp., *Luzula sylvatica*, *Lycopersicon* spp.
(например, *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Lycopersicon*
pyriforme), *Macrotyloma* spp., *Malus* spp., *Malpighia emarginata*, *Mammea americana*,
Mangifera indica, *Manihot* spp., *Manilkara zapota*, *Medicago sativa*, *Melilotus* spp.,
Mentha spp., *Miscanthus sinensis*, *Momordica* spp., *Morus nigra*, *Musa* spp., *Nicotiana*
spp., *Olea* spp., *Opuntia* spp., *Ornithopus* spp., *Oryza* spp. (например, *Oryza sativa*,
Oryza latifolia), *Panicum miliaceum*, *Panicum virgatum*, *Passiflora edulis*, *Pastinaca*
sativa, *Pennisetum* sp., *Persea* spp., *Petroselinum crispum*, *Phalaris arundinacea*,
Phaseolus spp., *Phleum pratense*, *Phoenix* spp., *Phragmites australis*, *Physalis* spp., *Pinus*
spp., *Pistacia vera*, *Pisum* spp., *Poa* spp., *Populus* spp., *Prosopis* spp., *Prunus* spp.,
Psidium spp., *Punica granatum*, *Pyrus communis*, *Quercus* spp., *Raphanus sativus*,
Rheum rhabarbarum, *Ribes* spp., *Ricinus communis*, *Rubus* spp., *Saccharum* spp., *Salix*
sp., *Sambucus* spp., *Secale cereale*, *Sesamum* spp., *Sinapis* sp., *Solanum* spp. (например,
Solanum tuberosum, *Solanum integrifolium* или *Solanum lycopersicum*), *Sorghum*
bicolor, *Spinacia* spp., *Syzygium* spp., *Tagetes* spp., *Tamarindus indica*, *Theobroma*
cacao, *Trifolium* spp., *Tripsacum dactyloides*, *Triticosecale rimpaui*, *Triticum* spp.
(например, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum turgidum*, *Triticum hybernum*,
Triticum macha, *Triticum sativum*, *Triticum monococcum* или *Triticum vulgare*),
Tropaeolum minus, *Tropaeolum majus*, *Vaccinium* spp., *Vicia* spp., *Vigna* spp., *Viola*
odorata, *Vitis* spp., *Zea mays*, *Zizania palustris*, *Ziziphus* spp., амарант, артишок,
спаржа, брокколи, брюссельская капуста, капуста, канола, морковь, цветная

капуста, сельдерей, листовая капуста, лен, капуста кормовая, чечевица, масличный рапс, окра, лук, картофель, рис, соя, клубника, сахарная свекла, сахарный тростник, подсолнечник, томат, тыква, чай и морская водоросль, помимо прочего. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения, растение является сельскохозяйственной культурой. Примеры сельскохозяйственных культур включают сою, подсолнечник, канолу, люцерну, семена рапса, хлопок, томат, картофель обыкновенный или табак. Более предпочтительно, растение является однодольным растением, таким, как сахарный тростник. Более предпочтительно, растение является зерновой культурой, такой, как рис, кукуруза, пшеница, ячмень, просо, рожь, сорго или овес.

В целом, под понятием «гербицид» в настоящем изобретении подразумевают ингредиент, который уничтожает, контролирует или каким-либо способом препятствует росту растения. Предпочтительным количеством или концентрацией гербицида является «эффективное количество» или «эффективная концентрация». Под «эффективным количеством» или «эффективной концентрацией» подразумевают количество или концентрация, соответственно, достаточные для уничтожения или препятствования росту подобного, дикого типа, растения, ткани растения, клетки растения или клетки-хозяина, но это количество не уничтожает или не препятствует таким же образом росту растений, тканей растения, клеток растения и клетки-хозяина, стойких к гербицидам, которые описаны в настоящем изобретении. Также эффективное количество гербицида – это количество, которое обычно используют в системах сельскохозяйственного производства для уничтожения интересующих сорняков. Специалистам известно такое количество. Гербициды, применимые по настоящему изобретению, проявляют свою активность при непосредственном нанесении на растение или на место произрастания растения на любом этапе роста или до его насаждения или прорастания. Эффект зависит от вида растения, этапа роста, параметров раствора при обработке и размера капель при опрыскивании, размера частиц твердых компонентов, внешних условий во время использования, используемого определенного состава, определенных адъювантов и носителей, типа почвы и других подобных параметров, а также от количества используемых химикатов. Эти и другие факторы можно регулировать способом, известным специалистам, чтобы вызвать селективную или неселективную активность гербицидов. Как правило

могут применяться варианты обработки гербицидами PPI (предварительное внесение в растение), PPSA (последующее внесение в поверхность растения), до появления всходов или после появления всходов. Для получения максимального контроля над сорняками послевсходовой обработке, как правило, подвергают нежелательные растения только что взошли.

Термин «устойчивые к гербициду» или «стойкие к гербициду» растения означает, что эти растения обладают устойчивостью или стойкостью, по меньшей мере, к одному гербициду, который при применении в таком количестве обычно уничтожает обычные или дикие растения или препятствует их росту. Специалистам известно количество гербицида, обычно вызывающее задержку роста нестойкого растения, и он может легко его определить. В примерах указано количество, рекомендованное производителями для применения. Максимальный уровень является примером такого количества гербицида, которое ведет к задержке роста растения, не обладающего устойчивостью. В рамках настоящего изобретения, термины «устойчивый к гербициду» и «обладающий стойкостью к гербициду» используют взаимозаменяемо; подразумевается, что они имеют одинаковое значение и эквивалентный объем. Аналогичным образом, в рамках настоящего изобретения, термины «устойчивость к гербициду» и «стойкость к гербициду» используют взаимозаменяемо; подразумевается, что они имеют одинаковое значение и эквивалентный объем. Аналогичным образом, в рамках настоящего изобретения, термины «устойчивый» и «стойкий» используют взаимозаменяемо; подразумевается, что они имеют одинаковое значение и эквивалентный объем. При использовании по тексту настоящего документа в отношении гербицидов, применимых в различных вариантах осуществления настоящего изобретения, такие термины как гербициды и подобные термины относятся к агрономически приемлемым активным ингредиентам (A.I.) гербицида, известным в данной области. Аналогично, такие термины как «фунгицид», «нематоцид», «пестицид» и т.д. относятся к другим агрономически приемлемым активным ингредиентам, широко применяемым в данной области.

В случае, когда такие термины как «гербицидоустойчивый» и «устойчивость к гербицидам» используют в отношении определенного мутантного фермента или полипептида, они обозначают способность такого фермента или полипептида осуществлять свою физиологическую активность в присутствии такого количества

А.І. гербицида, которое при нормальных условиях деактивирует или замедляет активность дикой (немутантной) версии указанного фермента или полипептида. С другой стороны, при использовании, в частности, по отношению к ферменту TgA данный термин относится, в частности, к способности метаболизировать, и тем самым инактивировать гербициды, которые подавляют биосинтез целлюлозы, так называемые ингибиторы биосинтеза целлюлозы (ИБЦ). Под термином «белок мутированной TgA, устойчивый к гербициду» или «белок мутированной TgA, стойкий к гербициду» подразумевают TgA-белок с большей метаболической активностью по сравнению с метаболической активностью белка TgA дикого типа в присутствии, по меньшей мере, одного гербицида, который влияет на биосинтез целлюлозы и при определенной концентрации или дозе внесения гербицида подавляет биосинтез целлюлозы. Метаболическая активность зависит от каталитической активности, присущей белку, и количества каталитически активного белка, присутствующего в ткани растения. Чтобы белок был каталитически активным, он должен быть правильно свернут. Неправильно свернутый белок или частично несвернутый белок может разлагаться цитозольными протеазами, что снижает количество каталитически активного белка в растительной ткани. Следовательно, желательно, чтобы белок мутированной TgA обладал устойчивостью к разложению протеазами. Более того, TgA-активность такого белка с мутированной TgA, устойчивого или стойкого к гербициду, в настоящем документе может именоваться TgA-активностью устойчивости или стойкости к гербициду.

При использовании по тексту настоящего документа термин «рекомбинантный» в отношении нуклеиновой кислоты или полипептида указывает, что такой материал был изменен в результате применения человеком технологии рекомбинации, например, рестрикции и лигирования полинуклеотидов, перекрывающегося расширения полинуклеотидов или геномной вставки или трансформации. Открытая рамка считывания генной последовательности является рекомбинантной, если определенная нуклеотидная последовательность была извлечена из своего природного контекста и клонирована в любой тип искусственного вектора нуклеиновой кислоты. Термин «рекомбинантный» может также относиться к организму, содержащему рекомбинантный материал, например, растение, содержащее рекомбинантную нуклеиновую кислоту, может считаться рекомбинантным растением.

Термин «трансгенное растение» относится к растению, которое содержит гетерологичный полинуклеотид. Предпочтительно, гетерологичный полинуклеотид стабильно встроен в геном, таким образом, полинуклеотид передается последующим поколениям. Гетерологичный полинуклеотид может быть встроен в геном отдельно или как часть рекомбинантной кассеты экспрессии. При использовании по тексту настоящего документа термин «трансгенный» относится к любой клетке, клеточной линии, каллусу, ткани, части растения или растению, генотип которых был изменен в результате присутствия гетерологичной нуклеиновой кислоты, включая трансгенные организмы или клетки, изначально измененные таким образом, а также трансгенные организмы или клетки, созданные путем скрещивания или бесполого размножения из исходного трансгенного организма или клетки. В некоторых вариантах осуществления «рекомбинантный» организм означает «трансгенный» организм. При использовании по тексту настоящего документа термин «трансгенный» не включает изменения генома (хромосомные или экстрахромосомные) в результате использования обычных методов разведения растений (например, скрещивания) или в результате происходящих в природе явлений, таких как, например, самооплодотворение, случайное перекрёстное опыление, нерекомбинантная вирусная инфекция, нерекомбинантная бактериальная трансформация, нерекомбинантная транспозиция или спонтанная мутация.

При использовании по тексту настоящего документа термин «мутировавший» относится к организму или к его ДНК с изменением(-ями) в биомолекулярной последовательности его нативного генетического материала по сравнению с последовательностью генетического материала соответствующего организма или ДНК дикого типа, причем такие изменения генетического материала были вызваны и/или выведены человеком. К примерам действий человека для получения мутировавшего организма или ДНК относятся, помимо прочего, обработка химическим мутагеном, таким как EMS, и последующая селекция с использованием гербицидов; или обработка клеток растения рентгеновским излучением и последующая селекция с использованием гербицидов. Любой способ, известный в данной области, может использоваться для получения мутации. Способы получения мутаций могут вызывать мутации в случайных позициях в генетическом материале, либо на определенных участках генетического

материала (т.е. могут быть использованы техники направленного мутагенеза), такие как использование метода генопластики.

При использовании по тексту настоящего документа «генетически модифицированный организм» (ГМО) – это организм, генетические характеристики которого изменены действиями человека, которые привели к трансфекции, в результате которой произошла трансформация целевого организма с использованием генетического материала из другого организма или организма-источника или с использованием синтетического или модифицированного природного генетического материала или организма, являющегося его потомком, сохраняющего введенный генетический материал. Организмом-источником может быть другой тип организма (например, растение ГМО может содержать бактериальный генетический материал) или тот же тип организма (например, растение ГМО может содержать генетический материал другого растения). При использовании по тексту настоящего документа в отношении растений и других организмов термины «рекомбинантный», «трансгенный» и «ГМО» считаются синонимами и указывают на наличие генетического материала или другого источника; напротив, при использовании термин «мутировавший» относится к растениям или иным организмам или к ДНК таких растений или организмов, где отсутствует такой трансгенный материал, однако в которых природный генетический материал мутировал таким образом, что он отличается от материала соответствующего организма или ДНК дикого типа.

При использовании по тексту настоящего документа термин «дикий тип» или «соответствующее растение дикого типа» обозначает типичную форму организма или его генетический материал в обычном виде, в отличие, например, от мутировавших и/или рекомбинантных форм. Аналогичным образом, под «контрольной клеткой» или «аналогичным растением, тканью растения, клеткой растения или клеткой-хозяином дикого типа» подразумевают растение, ткань растения, клетка растения или клетка-хозяин, соответственно, у которых отсутствуют характеристики стойкости к гербицидам и/или особый нуклеотид, описанные в настоящем изобретении. Понятие «дикий тип», таким образом, не подразумевает, что растение, ткань растения, клетка растения или другая клетка-хозяин не имеет рекомбинантную ДНК в геноме, и/или не имеет характеристик стойкости к гербицидам, отличных от тех, которые описаны в настоящем документе.

При использовании по тексту настоящего документа термин «потомок» относится к растению любого поколения. В некоторых вариантах осуществления потомком является растение первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого, восьмого, девятого или десятого поколения.

При использовании по тексту настоящего документа термин «потомство» относится к растению первого поколения.

Термин «семя» включает семена всех видов, такие, например, как собственно семена, зерновки, семянки, плоды, клубни, сеянцы и подобные формы. Если не указано иное, в контексте видов родов *Brassica* и *Sinapis* термин «семя» относится к собственно семенам. Например, семена могут обозначать семена трансгенных растений или растений, полученных с помощью традиционных способов разведения. Примеры традиционных методов разведения могут включать кроссбридинг, самооплодотворение, возвратное скрещивание, эмбриональное спасение, инкроссинг, ауткроссинг, инбридинг, селекцию, бесполое размножение и другие традиционные методы, известные специалистам.

Несмотря на то, что в настоящем документе в соответствии с вариантами осуществления изобретения приведены примеры применения в отношении определенных растений или видов растений и их гибридов, способы, описанные в настоящем документе, в которых используются гербициды, могут применяться с различными коммерчески ценными растениями. Линии растений с устойчивостью к гербицидам, которые могут применяться в соответствии с настоящим изобретением согласно описанию, могут быть использованы в способах борьбы с сорняками непосредственно или косвенно, т.е. в качестве культур, обрабатываемых гербицидами, или в качестве устойчивых к гербициду донорских линий для развития, для получения других сортовых и/или гибридных культур, обладающих такой характеристикой или характеристиками. Все такие полученные сорта или гибриды культур, содержащие наследственную характеристику или характеристики устойчивости к гербициду, называют в данном документе потомством или потомками линии (или линий), устойчивой к гербициду. Можно сказать, что такие полученные растения сохранили «характеристики устойчивости к гербицидам» предкового растения, т.е. это означает, что они имеют и экспрессируют предковые генетические молекулярные компоненты, отвечающие за такую характеристику.

Согласно одному аспекту настоящим изобретением предоставляется растение или часть растения, содержащие полинуклеотид, кодирующий полипептид мутированной TrtA, при этом экспрессия указанного полинуклеотида придает растениям или частям растений устойчивость к гербицидам.

В предпочтительном варианте осуществления растение предварительно было получено с помощью процесса, включающего рекомбинантную подготовку растения путем введения и сверхэкспрессии трансгена TrtA дикого типа или трансгена мутированной TrtA в соответствии с настоящим изобретением согласно более подробному описанию ниже.

В еще одном варианте осуществления изобретения полинуклеотид, кодирующий полипептид мутированной TrtA, содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или ее вариант или производное.

В соответствии с другими вариантами осуществления изобретения полипептид TrtA мутированной TrtA по настоящему изобретению, является функциональным вариантом, имеющим по всей длине варианта, по меньшей мере, около 80%, для наглядности, по меньшей мере, около 80%, 90%, 95%, 98%, 99% или более идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 2.

В еще одном варианте осуществления изобретения полипептид мутированной TrtA, применяющийся в соответствии с настоящим изобретением, является функциональным фрагментом полипептида, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

Установлено, что полинуклеотидные молекулы TrtA и полипептиды TrtA изобретения охватывают полинуклеотидные молекулы и полипептиды с нуклеотидной или аминокислотной последовательностью, достаточно идентичной нуклеотидной последовательности, представленной далее в SEQ ID NO: 1 или аминокислотным последовательностям, представленным далее в SEQ ID: 2. Термин «достаточно идентичный» подразумевает в настоящем документе первую аминокислотную или нуклеотидную последовательность, которая содержит достаточное или минимальное число аминокислотных радикалов или нуклеотидов, идентичных или эквивалентных (например, с похожей боковой цепочкой) второй аминокислотной или нуклеотидной последовательности таким образом, что первая и вторая аминокислотная или нуклеотидная последовательности имеют общий структурный домен и/или общую функциональную активность.

В целом, «идентичность последовательности» подразумевает ту степень, в которой две оптимально выравненные последовательности ДНК или аминокислоты неизменны в окне выравнивания компонентов, например, нуклеотидов или аминокислот. Термин «относительное идентичное количество» для выравненных сегментов исследуемой или эталонной последовательности означает число идентичных компонентов в двух выравненных последовательностях, разделенное на общее число компонентов в сегменте эталонной последовательности, т.е. целой эталонной последовательности или меньшей определенной части эталонной последовательности. «Процент идентичности» – это доля идентичности от 100%. Оптимальное выравнивание последовательностей для выравнивания сравнительного участка хорошо известно специалистам и может осуществляться с помощью таких инструментов, как алгоритм локальной гомологии Смита и Ватермана, алгоритм гомологического выравнивания Нидлмана-Вунша, метод поиска сходства Пирсона-Липмана, и предпочтительно с помощью компьютеризированного обеспечения этих алгоритмов, такого как GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA, доступного как часть программного пакета GCG. Wisconsin Package. (Accelrys Inc. Burlington, Mass.)

Полинуклеотиды и олигонуклеотиды

Под термином «изолированный полинуклеотид», включая ДНК, РНК или их комбинацию, односпиральные или двухспиральные, в смысловой или натисмысловой ориентации или в их сочетании, дсРНК или иные варианты, следует понимать полинуклеотид, который, по крайней мере, частично, отделен от последовательностей полинуклеотидов, с которыми он связан или к которым привязан в своем естественном состоянии. Предпочтительно, изолированный полинуклеотид, по меньшей мере, на 60%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 75%, и наиболее предпочтительно на 90% свободен от других компонентов, с которыми он обычно связан в природе. Известно, что изолированный полинуклеотид может быть экзогенным и присутствовать, например, в трансгенном организме, которые в естественных условиях не содержат данный полинуклеотид. Кроме того, термины «полинуклеотид(ы)», «последовательность нуклеиновой кислоты», «нуклеотидная последовательность(и)», «нуклеиновая кислота(ы)», «молекула нуклеиновой кислоты» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к

нуклеотидам, рибонуклеотидам либо дезоксирибонуклеотидам или к их комбинации, в полимерной неразветвленной форме любой длины.

Термин «нуклеиновая кислота мутированной TrtA» относится к TrtA-нуклеиновой кислоте, которая имеет последовательность, мутировавшую из нуклеиновой кислоты TrtA дикого типа, и которая придает повышенную устойчивость к гербицидам растению, в котором происходит ее экспрессия. Кроме того, термин «мутированная меламинадиаминаза (мутированная TrtA)» относится к замещению аминокислоты первичной последовательности дикого типа SEQ ID NO: 2 или ее вариантом, производном, гомологом, ортологом или паралогом, другой аминокислотой. Выражение «мутированная аминокислота» будет использоваться ниже для определения аминокислоты, которая замещена другой аминокислотой, обозначая тем самым место мутации в первичной последовательности белка.

В предпочтительном варианте осуществления нуклеотидная последовательность TrtA, кодирующая мутированную TrtA, включает последовательность SEQ ID NO: 1 или ее вариант или производное.

Кроме того, специалистам очевидно, что нуклеотидные последовательности TrtA включают гомологи, паралоги и ортологи SEQ ID NO: 1 согласно определению в настоящем документе.

Термин «вариант» в отношении последовательности (например, полипептидной последовательности или нуклеотидной последовательности, такой, например, как регулирующая транскрипцию нуклеотидная последовательность по настоящему изобретению) означает существенно схожие последовательности. Для нуклеотидных последовательностей, включающих открытую рамку считывания, варианты включают те последовательности, которые вследствие дегенерации генетического кода, кодируют идентичную аминокислотную последовательность нативного белка. Такие природные аллельные варианты могут быть идентифицированы при помощи известных методов молекулярной биологии таких как, например, метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) и метод гибридизации. Вариантные нуклеотидные последовательности также включают нуклеотидные последовательности, полученные синтетическим методом, такие как последовательности, образованные, например, путем направленного мутагенеза и для открытых рамок считывания кодируют нативный белок, содержащий последовательность SEQ ID NO: 2, а также последовательности, кодирующие

полипептид с аминокислотными замещениями относительно нативного белка, например, мутированная TrtA по настоящему изобретению, согласно описанию в настоящем документе. В целом, варианты нуклеотидной последовательности по изобретению будут иметь, по меньшей мере, 30, 40, 50, 60 и до 70%, например, предпочтительно 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78% и до 79%, в целом, по меньшей мере, 80%, например, 81%-84%, по меньшей мере, 85%, например, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, до 98% и 99% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1. Процентную идентичность последовательности полинуклеотида определяют с использованием GAP-анализа (Нидлман и Вунш, 1970) (программа GCG) со штрафом на внесение делеции=5 и штрафом на продолжение делеции = 0,3. Если не указано иное, искомая последовательность имеет длину, по меньшей мере, 45 нуклеотидов, а также с помощью GAP-анализа выравниваются две последовательности на участке длиной, по меньшей мере, 45 нуклеотидов. Предпочтительно, искомая последовательность имеет длину, по меньшей мере, 150 нуклеотидов, а также с помощью GAP-анализа выравниваются две последовательности на участке длиной, по меньшей мере, 150 нуклеотидов. Более предпочтительно, искомая последовательность имеет длину, по меньшей мере, 300 нуклеотидов, а также с помощью GAP-анализа выравниваются две последовательности на участке длиной, по меньшей мере, 300 нуклеотидов. Еще более предпочтительно, с помощью GAP-анализа выравниваются две последовательности по всей их длине.

Полипептиды

Термин «существенно очищенный полипептид» или «очищенный полипептид» означает, что полипептид был отделен от одного или более липидов, нуклеиновых кислот, других полипептидов или других молекул-загрязнителей, с которыми он связан в естественных условиях. Предпочтительно, чтобы существенно очищенный полипептид был, по меньшей мере, на 60%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 75%, и наиболее предпочтительно на 90% свободен от других компонентов, с которыми он обычно связан в природе. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что в качестве очищенного полипептида может выступать полипептид, полученный рекомбинантным способом. Термины «полипептид» и «белок» в целом используют

взаимозаменяемо в настоящем документе и относятся к одиночной цепи полипептидов, которая может модифицироваться или не модифицироваться при добавлении неаминокислотных групп. Предполагается, что такие цепи полипептидов могут соединяться с другими полипептидами или белками или иными молекулами, такими как кофакторы. Термины «белки» и «полипептиды» при использовании в настоящем документе также включают варианты, мутантов, модификации, аналоги и/или производные полипептидов по изобретению согласно описанию в настоящем документе.

Процентную идентичность полипептида определяют с использованием GAP-анализа (Нидлман и Вунш, 1970) (программа GCG), в рамках которого пробел создания разрыва=5, а штраф на продолжение делеции = 0,3. Искомая последовательность имеет длину, по меньшей мере, 25 аминокислот, и с помощью GAP-анализа производится выравнивание двух последовательностей на участке длиной, по меньшей мере, 25 аминокислот. Более предпочтительно, искомая последовательность имеет длину, по меньшей мере, 50 аминокислот, и с помощью GAP-анализа производится выравнивание двух последовательностей на участке длиной, по меньшей мере, 50 аминокислот. Более предпочтительно, искомая последовательность имеет длину, по меньшей мере, 100 аминокислот, и с помощью GAP-анализа производится выравнивание двух последовательностей на участке длиной, по меньшей мере, 100 аминокислот. Еще более предпочтительно, искомая последовательность имеет длину, по меньшей мере, 250 аминокислот, и с помощью GAP-анализа производится выравнивание двух последовательностей на участке длиной, по меньшей мере, 250 аминокислот. Еще более предпочтительно, с помощью GAP-анализа выравниваются две последовательности по всей их длине.

Относительно описанного полипептида, будет предпочтительно, чтобы значения процентной идентичности больше тех, что указаны выше, включали предпочтительные варианты осуществления изобретения. Таким образом, в соответствующих случаях, учитывая цифры минимальной процентной идентичности, предпочтительно, чтобы полипептид TrtA по изобретению включал аминокислотную последовательность которая имеет, по меньшей мере, 40%, более предпочтительно, по меньшей мере, 45%, более предпочтительно, по меньшей мере, 50%, более предпочтительно, по меньшей мере, 55%, более предпочтительно, по меньшей мере, 60%, более предпочтительно, по меньшей мере, 65%, более

предпочтительно, по меньшей мере, 70%, более предпочтительно, по меньшей мере, 75%, более предпочтительно, по меньшей мере, 80%, более предпочтительно, по меньшей мере, 85%, более предпочтительно, по меньшей мере, 90%, более предпочтительно, по меньшей мере, 91%, более предпочтительно, по меньшей мере, 92%, более предпочтительно, по меньшей мере, 93%, более предпочтительно, по меньшей мере, 94%, более предпочтительно, по меньшей мере, 95%, более предпочтительно, по меньшей мере, 96%, более предпочтительно, по меньшей мере, 97%, более предпочтительно, по меньшей мере, 98%, более предпочтительно, по меньшей мере, 99%, более предпочтительно, по меньшей мере, 99.1%, более предпочтительно, по меньшей мере, 99.2%, более предпочтительно, по меньшей мере, 99.3%, более предпочтительно, по меньшей мере, 99.4%, более предпочтительно, по меньшей мере, 99.5%, более предпочтительно, по меньшей мере, 99.6%, более предпочтительно, по меньшей мере, 99.7%, более предпочтительно, по меньшей мере, 99.8%, и еще более предпочтительно, по меньшей мере, 99.9% идентичности с SEQ ID NO: 2.

Под термином «вариант» полипептида следует понимать полипептид, полученный из белковой последовательности SEQ ID NO: 2 путем удаления (т. н. усечения) или добавления одной или более аминокислот к N-концевой и/или C-концевой области нативного белка; путем удаления или добавления одной или более аминокислот на одном или более участках нативного белка; или путем замещения одной или более аминокислот на одном или более участках нативного белка. Такие варианты могут быть получены, например, в результате генетического полиморфизма или манипуляций, совершенных человеком. Способы таких манипуляций хорошо известны специалистам.

«Производные» белка включают пептиды, олигопептиды, полипептиды, белки и ферменты, имеющие аминокислотные замещения, делеции и/или вставки относительно интересующего немодифицированного белка и имеющие схожую биологическую и функциональную активность, как у немодифицированного белка, из которого они получены. Таким образом, за исключением случаев, когда специально указано иное, в объем настоящего изобретения входят функциональные варианты и фрагменты полипептидов TrtA, и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие их, вне зависимости от происхождения указанного полипептида и вне зависимости от того, встречается ли он в

естественных условиях. Для определения функциональности полипептида TrtA могут быть использованы различные анализы. Например, может проводиться анализ функционального варианта или фрагмента полипептида TrtA для определения его способности передавать гербицидам детоксикацию. Например, степень детоксификации гербицидов может быть определена как скорость катализации, достаточная для того, чтобы обеспечить измеримое увеличение устойчивости к гербицидам в растении или части растения, содержащих рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий вариант или фрагмент полипептида TrtA, при этом в растении или части растения осуществляется экспрессия указанного варианта или фрагмента приблизительно до 0,5%, например, приблизительно 0,05 - 0,5%, приблизительно 0,1 - 0,4% и приблизительно 0,2 - 0,3% от общего количества клеточного белка по сравнению с обработанным аналогичным образом контрольным растением, в котором не осуществляется экспрессия указанного варианта или фрагмента.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения полипептид мутированной TrtA является функциональным вариантом или фрагментом меламинамидазы с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, причем такой функциональный вариант или фрагмент имеет по меньшей мере, около 80% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 2.

В соответствии с другими вариантами осуществления изобретения указанный функциональный вариант или фрагмент обладает степенью детоксификации гербицидов, которая может быть определена как степень катализации, достаточная для того, чтобы обеспечить измеримое увеличение устойчивости к гербицидам в растении или части растения, содержащих рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий указанный вариант или фрагмент, при этом в растении или части растения осуществляется экспрессия указанного варианта или фрагмента до приблизительно 0,5% от общего количества клеточного белка по сравнению с обработанным аналогичным образом контрольным растением, в котором не осуществляется экспрессия указанного варианта или фрагмента.

«Гомологи» белка включают пептиды, олигопептиды, полипептиды, белки и ферменты, имеющие аминокислотные замещения, удаления и/или вставки относительно интересующего немодифицированного белка и имеющие схожую

биологическую и функциональную активность с немодифицированным белком, из которого они получены.

Кроме того, специалистам в данной области техники должно быть понятно, что в нуклеотидные последовательности по изобретению могут быть введены изменения путем мутации, в результате чего будет изменена аминокислотная последовательность кодируемых белков без изменения биологической активности белков. Так, например, изолированная молекула полинуклеотида, кодирующая полинуклеотид с мутированной Tt1A, с аминокислотной последовательностью, отличной от SEQ ID NO: 2, может создаваться путем введения одного или более нуклеотидных замещений, добавлений или удалений в соответствующую нуклеотидную последовательность таким образом, чтобы одно или несколько аминокислотных замещений, добавлений или удалений вводили в кодированный белок. Мутации могут быть введены с применением стандартных методов, таких как сайт-направленный и ПЦР-опосредованный мутагенез. Такие варианты нуклеотидные последовательности также входят в объем настоящего изобретения. Например, предпочтительно, консервативные аминокислотные замещения могут выполняться в одном или более прогнозных, предпочтительно в заменимых аминокислотных остатках. «Заменяемый» аминокислотный остаток – это остаток в белковой последовательности дикого типа, который может быть изменен без изменения биологической активности, в то время как «незаменяемый» аминокислотный остаток – это остаток необходимый для биологической активности.

Термин «удаление» относится к удалению одной или более аминокислот из белка.

Термин «вставка» относится к одному или более аминокислотному остатку, который вводят в установленное место в белке. Вставки могут включать слияния на N- и/или C-конце, а также вставки единичных или множественных аминокислот внутри последовательности. Обычно, вставки внутри аминокислотной последовательности будут меньше, чем слияния N- и C-конца, порядка приблизительно 1 - 10 остатков. Примеры белков или пептидов слияний N- и C-конца включают связывающий или активационный домен транскрипционного активатора, как использовано в двухгибридной системе дрожжей, фаговых белках оболочки, гистидин-6-маркере, глутатион S-трансфераза-маркере, белке A, связывающем мальтозу белке, дигидрофолат редуктазе, Tag•100 эпитопе, с-мик

эпителии, FLAG®-эпителии, lacZ, СМР (калмодулин-связывающий белок), НА эпителии, белок С эпителии и VSV эпителии.

Термин «замещение» означает замещение аминокислот белков другими аминокислотами со схожими характеристиками (такими как схожая гидрофобность, гидрофильность, антигенность, склонность к формированию или разрушению α -спиральных или β -пластинчатых структур). Обычно аминокислотные остатки замещены единичными остатками, но могут группироваться в зависимости от функциональных ограничений, наложенных на полипептид, и могут варьироваться от 1 до 10 аминокислот; вставки обычно составляют от 1 до 10 аминокислотных остатков. Под «консервативным замещением аминокислоты» понимают замещение, в которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, имеющим схожую боковую цепочку. Семейства аминокислотных остатков, имеющих схожие боковые цепочки, были описаны в литературе в данной области. Данные семейства включают аминокислоты с боковыми цепочками оснований (например, лизин, аргинин, гистидин), боковыми цепочками кислот (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепочки (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистин), неполярные боковые цепочки (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепочки (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепочки (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Такие замещения не осуществляют для консервативных аминокислотных остатков или для аминокислотных остатков, находящихся в консервативном мотиве. Таблицы консервативных замещений хорошо специалистам (например, см. Creighton (1984) *Proteins*. W.H. Freeman and Company (Изд).

Аминокислотные замещения, делеции и/или вставки могут осуществляться с использованием технологий синтеза пептидов, хорошо известных специалистам, например, пептидный синтез на твердой фазе, либо с помощью манипуляции с рекомбинантной ДНК. Методы манипуляции с последовательностями ДНК для осуществления замещения, удаления и/или вставки вариантов белков, хорошо известны в технологии. Например, методы создания мутантов путем замещений на определенных сайтах ДНК известны специалистам и включают M13 мутагенез, T7-

Gen in vitro мутагенез (USB, Cleveland, OH), сайт-направленный мутагенез по методу QuickChange (Stratagene, Сан-Диего, CA), ПЦР-опосредованный сайт-направленный мутагенез или другие протоколы сайт-направленного мутагенеза.

«Производные» также включают пептиды, олигопептиды, полипептиды, которые по сравнению с аминокислотной последовательностью природной формы белка, такого как интересующий белок, могут включать аминокислотные замещения с неприродными аминокислотными остатками, либо присоединения неприродных аминокислотных остатков. «Производные» белка также включают пептиды, олигопептиды, полипептиды, которые включают природные измененные (гликозилированные, ацилированные, пренилированные, фосфорилированные, миристоилированные, сульфатированные и т.д.) или неприродно измененные аминокислотные остатки по сравнению с аминокислотной последовательностью природной формы полипептида. Производное может также содержать один или более неаминокислотных заместителей или присоединений, по сравнению с аминокислотной последовательностью, из которой оно получено, например, молекулу-репортера или другой лиганд, ковалентно или не ковалентно связанный с аминокислотной последовательностью, такой как молекула-репортер, которая связана для облегчения ее обнаружения, и неестественно образованные аминокислотные остатки, родственные аминокислотной последовательности природного белка. Кроме того, «производные» также включают слияния природной формы белка с маркерными пептидами, такими как FLAG, HIS6 или тиоредоксин (обзор маркерных пептидов приведен в работе Terpe, Appl. Microbiol. Biotechnol. 60, 523-533, 2003).

«Ортологи» и «паралоги» включают эволюционные понятия, описывающие наследственные взаимосвязи генов. Паралоги – это гены одного и того же вида, образовавшиеся в результате дупликации наследственного гена; ортологи – это гены разных организмов, образовавшиеся в результате видообразования, которые также происходят от общего наследственного гена.

Примерами вариантов, ортологов и паралогов последовательности SEQ ID NO:2, которые входят в объем настоящего изобретения, являются, помимо прочего, полипептиды, включающие SEQ ID NO: 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 или 31.

Специалистам хорошо известно, что паралоги и ортологи могут иметь общие домены, содержащие подходящие аминокислотные радикалы на данных участках, такие как связывающие карманы для определенных субстратов или связывающие мотивы для взаимодействия с другими белками.

Понятие «домен» относится к набору аминокислот, которые являются консервативными в определенных позициях в выравнивании последовательностей эволюционно родственных белков. В то время как аминокислоты в других положениях могут различаться между гомологами, аминокислоты, являющиеся высококонсервативными в специфических положениях, означают аминокислоты, которые, вероятно, являются незаменимыми для структуры, стабильности или функции белка. Они идентифицируются по высокой степени консерватизма в выравниваемых последовательностях семейства белковых гомологов и могут быть использованы в качестве идентификаторов для определения, принадлежит ли данный полипептид к ранее идентифицированному семейству полипептидов.

Термин «мотив» или «консенсусная последовательность» относится к короткому консервативному участку в последовательности эволюционно родственных белков. Мотивы зачастую – это высококонсервативные части доменов, однако также могут включать только часть домена или находиться вне консервативного домена (если все аминокислоты мотива оказываются вне данного домена).

Для определения доменов существуют специализированные базы данных, например, SMART (Schultz et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. США* 95, 5857-5864; Letunic et al. (2002) *Nucleic Acids Res* 30, 242-244), InterPro (Mulder et al., (2003) *Nucl. Acids. Res.* 31, 315-318), Prosite (Bucher and Bairoch (1994), A generalized profile syntax for biomolecular sequences motifs and its function in automatic sequence interpretation. (In) *ISMB-94; Proceedings 2nd International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*. Altman R., Brutlag D., Karp P., Lathrop R., Searls D., Изд., стр. 53-61, AAAI Press, Menlo Park; Hulo et al., *Nucl. Acids. Res.* 32:D134-D137, (2004)), или Pfam (Bateman et al., *Nucleic Acids Research* 30(1): 276-280 (2002)). Набор средств для *in silico* анализа белковых последовательностей доступен на сервере по протеомике ExPASy (Шведский институт биоинформатики (Gasteiger et al., ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, *Nucleic Acids Res.* 31:3784-3788(2003)). Домены или мотивы могут быть определены с помощью стандартных техник, таких как выравнивание последовательностей.

Методы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны специалистам в данной области, эти методы включают GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA и TFASTA. GAP использует алгоритм Нидлмана-Вунша ((1970) *J Mol Biol* 48: 443-453) для нахождения глобального (т.е. охватывающего последовательности целиком) выравнивания двух последовательностей, что делает число совпадений максимальным, а число пробелов – минимальным. С помощью алгоритма BLAST (Altschul et al. (1990) *J Mol Biol* 215: 403-10) производится подсчет идентичности последовательности в процентном отношении и производится статистический анализ сходства двух последовательностей. Программное обеспечение для проведения BLAST-анализа находится в открытом доступе в Национальном центре биотехнологической информации (NCBI). Гомологи можно легко определить с помощью, например, алгоритма программы ClustalW для множественного выравнивания последовательностей (версия 1.83) с установленными по умолчанию параметрами попарного выравнивания и с помощью метода расчета процентного соотношения (См. Фиг. 1). Глобальное процентное соотношение схожести и идентичности можно также определить с помощью одного из методов, доступных в пакете программы MatGAT (Campanella et al., *BMC Bioinformatics*. 10 июля 2003; 4:29. MatGAT: приложение, которое образует матрицы схожести/идентичности, используя последовательности белков или ДНК). Специалисту известно, что можно осуществить небольшое изменение настроек для оптимизации выравнивания между консервативными мотивами. Кроме того, при идентификации гомологов вместо последовательностей с полной длиной могут быть использованы отдельные домены. Значение идентичности последовательности может быть определено по всей нуклеотидной или аминокислотной последовательности или по выбранным доменам или консервативному мотиву (мотивам), используя упомянутые выше программы с параметрами по умолчанию. Для локального выравнивания может использоваться, в частности, алгоритм Смита-Ватермана (Smith TF, Waterman MS (1981) *J. Mol. Biol* 147(1);195-7).

Белки по изобретению могут быть модифицированы различными способами, включая аминокислотные замещения, делеции, усечения и вставки. Способы таких манипуляций хорошо известны специалистам. Например, варианты аминокислотной последовательности могут изготавливаться посредством мутаций

в ДНК. Методы мутагенеза и изменения нуклеотидных последовательностей хорошо известны специалистам. Смотрите, например, Kunkel (1985) PNAS, 82:488-492; Kunkel et al. (1987) Methods in Enzymol. 154: 367-382; патент США № 4,873,192; Walker and Gaastra, изд. (1983) Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, Нью-Йорк) и ссылки, указанные в данных документах. Указания в отношении соответствующих аминокислотных замещений, которые не влияют на биологическую активность интересующего белка, можно найти в модели Dayhoff et al. (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D. C), включенной в настоящую заявку посредством ссылки. Предпочтительными могут быть консервативные замещения, например, замещение одной аминокислоты другой аминокислотой с аналогичными свойствами.

В качестве альтернативы, варианты нуклеотидные последовательности могут быть получены путем введения мутаций случайным образом вдоль всей кодирующей последовательности или ее части, например, с помощью насыщающего мутагенеза, и может осуществляться скрининг полученных мутантов для идентификации мутантов, кодирующих белки, сохраняющие активность. Например, после мутагенеза кодированный белок может быть экспрессирован рекомбинантным образом, а активность белка может определяться с использованием стандартных методов анализа.

Авторами настоящего изобретения было обнаружено, что путем замещения одного или более ключевых аминокислотных остатков фермента TrtA последовательности SEQ ID NO: 2, например, путем использования одного из вышеописанных способов для мутации нуклеиновых кислот, кодирующих TrtA, можно значительно повысить устойчивость или стойкость к определенным гербицидам. Предпочтительными замещениями мутированной TrtA являются те, которые повышают устойчивость растения к гербицидам, но существенно не влияют на биологическую активность диаминазы.

Соответственно, еще одна цель настоящего изобретения относится к полипептиду мутированной TrtA, который содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых ключевой аминокислотный остаток замещен любой другой аминокислотой.

Для специалистов понятно, что аминокислоты, расположенные вблизи от указанных далее положений аминокислот, также могут быть замещены. Таким образом, в другом варианте осуществления вариант SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог содержат мутированную TrtA, причем аминокислота, расположенная на расстоянии ± 3 , ± 2 или ± 1 аминокислотного положения от ключевой аминокислоты, замещена любой другой аминокислотой.

С использованием методов, известных специалистам, можно создать высокохарактерный паттерн последовательности, с помощью которого можно осуществлять поиск других вариантов мутированных TrtA с целевой активностью.

Поиск других вариантов мутированной TrtA с помощью соответствующего паттерна последовательности также охватывается настоящим изобретением. Для специалиста будет очевидно, что данный паттерн последовательности не ограничивается точным расстоянием между двумя смежными аминокислотными радикалами этого паттерна. Каждое расстояние между двумя соседними радикалами в упомянутом паттерне может, например, варьироваться независимо друг от друга и составлять до ± 10 , ± 5 , ± 3 , ± 2 или ± 1 аминокислотных позиций, что не влияет существенно на желаемую активность.

Кроме того, при применении метода сайт-направленного мутагенеза, например, насыщающего мутагенеза (см., например, Schenk et al., Biospektrum 03/2006, стр. 277-279), авторы настоящего изобретения выявили и создали особые аминокислотные замещения и их комбинации, которые, при их введении в растение посредством трансформации и экспрессирования соответствующей мутированной TrtA, кодирующей нуклеиновую кислоту, придают указанному растению повышенную стойкость или устойчивость к гербицидам.

Таким образом, в особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения вариант или производная мутированной TrtA означает полипептид TrtA, включающий последовательность SEQ ID NO: 2, ее ортолог, паралог или гомолог, приче аминокислотная последовательность отличается от аминокислотной последовательности дикого типа полипептида TrtA в одном или более положениях, соответствующих следующим положениям SEQ ID NO: 2: 92, 93, 155, 157.

Примеры отличий в положениях аминокислоты включают, но не ограничиваются ими, одно или более из следующих:

аминокислота, соответствующая позиции 92, замещена любой другой аминокислотой;

аминокислота, соответствующая позиции 93, замещена любой другой аминокислотой;

аминокислота, соответствующая позиции 155, замещена любой другой аминокислотой;

аминокислота, соответствующая позиции 157, замещена любой другой аминокислотой;

Примеры отличий в положениях аминокислоты включают, но не ограничиваются ими, одно или более из следующих:

аминокислота, соответствующая позиции 92 не является Лейцином;

аминокислота, соответствующая позиции 93 не является Тирозином;

аминокислота, соответствующая позиции 155 не является Метионином;

аминокислота, соответствующая позиции 157 не является Фенилаланином;

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Ala, Cys, Asp, Glu, Leu, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Met, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Cys, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Asp, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и

аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Glu, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Gly, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой His, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ile, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Met, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Asn, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Pro, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Gln, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ser, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Val, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Ala, Cys, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Ala, и

аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Cys, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Glu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Phe, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Gly, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой His, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Ile, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Lys, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Met, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Asn, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Gln, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Arg, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Ser, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Val, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Trp, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Ala, Cys, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Ser, Val, Tyr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Cys, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TrtA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Gly, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TrtA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой His, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TrtA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Ile, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TrtA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Lys, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Asn, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Pro, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Gln, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Ser, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Val, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Tyr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Ala, Cys, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и

аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Ala.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Cys.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Glu.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Gly.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой His.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Ile.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Lys.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Met.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Asn.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Gln.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Arg.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Ser.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Thr.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Val.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TrtA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Trp.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления, мутированная TrtA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Trp.

Специалистам в данной области известно, как определить консервативные участки и мотивы, общие для гомологов, ортологов и паралогов, кодируемых SEQ ID NO: 1. После определения таких консервативных участков, которые могут представлять собой подходящие связывающие мотивы, можно выбрать аминокислоты, которые могут быть замещены любой другой аминокислотой, например, консервативными аминокислотами, предпочтительно аминокислотными замещениями, описанными выше с использованием SEQ ID NO: 2 в качестве эталона.

Другая цель настоящего изобретения относится к способу идентификации нуклеотидной последовательности, кодирующей мутированную TrtA, которая является стойкой или устойчивой к гербициду, при этом способ включает:

- a) получение библиотеки нуклеиновых кислот, кодирующих мутированную TrtA,
- b) скрининг популяции полученных нуклеиновых кислот, кодирующих мутированную TrtA, путем экспрессии каждой указанной нуклеиновой кислоты в клетке или растении и обработка этой клетки или растения гербицидом,
- c) сравнение уровней устойчивости к гербицидам, которые получены из данной популяции нуклеиновых кислот, кодирующих мутированную

Tg1A, с уровнями устойчивости к гербициду, которые получены из контрольной нуклеиновой кислоты, кодирующей Tg1A,

- d) селекция, по меньшей мере, одной нуклеиновой кислоты, кодирующей мутированную Tg1A, которая показывает значительно повышенный уровень устойчивости к гербициду по сравнению с контрольной нуклеиновой кислотой, кодирующей Tg1A.

Уровни устойчивости к гербицидам также могут быть определены измерением скорости детоксикации в клетке, ткани или растении.

Скорость детоксикации – это скорость разложения гербицида в течение определенного промежутка времени в соответствующей ткани. Разложение и образование продукта могут быть определены аналитически, например, методом жидкостной хроматографии (LC) в сочетании с использованием масс-спектрометра (MS) высокого разрешения (HR). Продукт можно определить посредством сравнения со стандартом оригинала и/или за счет выяснения структуры.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая мутированную Tg1A и выбранная на этапе d), демонстрирует устойчивость и стойкость клетки или растения к гербициду выше, по меньшей мере, в два раза по сравнению с устойчивостью контрольной нуклеиновой кислоты, кодирующей Tg1A.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения, нуклеиновая кислота, кодирующая мутированную Tg1A, выбранная на этапе d), показывает, стойкость или устойчивость клетки или растения к гербициду, выше, по меньшей мере, в 2 раза, по меньшей мере, в 5 раз, по меньшей мере, в 10 раз, по меньшей мере, в 20 раз, по меньшей мере, в 50 раз, по меньшей мере, 100 в раз, по меньшей мере, в 500 раз по сравнению с устойчивостью, которая обеспечивается контрольной нуклеиновой кислотой, кодирующей Tg1A.

Стойкость или устойчивость может быть определена путем получения трансгенного растения или клетки-хозяина, предпочтительно клетки растения, содержащей нуклеотидную последовательность из библиотеки согласно этапу a), и путем сравнения этого трансгенного растения с контрольным растением или клеткой-хозяином, предпочтительно с клеткой растения.

Специалистам в данной области хорошо известны методы для получения подходящих вариантов нуклеиновых кислот для идентификации нуклеотидной последовательности, кодирующей мутированную TrtA из множества различных потенциальных материнских организмов, включающих микробы, растения, грибы, водоросли, смешанные культуры и т.д., а также из природных источников ДНК, таких как почва. Эти методы включают, помимо прочего, подготовку библиотек кДНК или геномной ДНК, использование подходящих дегенеративных олигонуклеотидных праймеров, использование зондов, основываясь на известных последовательностях или структурном анализе комплементации (например, рост под воздействием тирозина), а также использование мутагенеза и смешения для получения рекомбинантных или смешанных последовательностей, кодирующих мутированную TrtA.

Нуклеиновые кислоты, включающие вариантные или контрольные последовательности, кодирующие TrtA, могут экспрессироваться в дрожжах, в бактериальном штамм-хозяине, водорослях или высших растениях, таких как табак или арабидопсис, и проходят проверку на относительные уровни наследственной устойчивости последовательностей, кодирующих TrtA, основанную на визуальном определении фенотипа трансформированного штамма или растения в присутствии разных концентраций выбранного гербицида. Данные о зависимости между дозой и эффектом или изменения в эффекте доз, связанные с такими индикаторными фенотипами (формирование коричневого цвета на листьях, подавление роста растений, воздействие гербицидов и т.д.) удобно выражать в виде значений GR50 (концентрация, при которой скорость роста растений снижается на 50 %) или МИК (минимальная ингибирующая концентрация), где увеличение значений соответствует повышению врожденной устойчивости экспрессированной TrtA. Например, при системе экспресс-анализа, основанной на трансформации бактерии, такой как *E. coli*, каждая последовательность, кодирующая мутированную TrtA, может экспрессироваться, например, как последовательность ДНК под экспрессионным контролем контролируемого промотора, такого как промотор *lacZ*, учитывая такие показатели (например, с использованием синтетической ДНК), как частота использования кодонов, для получения по возможности аналогичного для разных последовательностей TrtA уровня экспрессии. Такие штаммы, экспрессирующие нуклеиновые кислоты, включающие альтернативные

варианты последовательностей TgA, могут быть высеяны при различных концентрациях выбранного гербицида дополнительно, в среде с тирозином, и можно определить относительные уровни наследственной устойчивости экспрессированных TgA ферментов на основе степени и минимальной ингибирующей концентрации (МИК, МПК) ингибирования образования с коричневым охронотическим пигментом.

В другом варианте осуществления возможные нуклеиновые кислоты трансформируются в растительный материал для получения трансгенного растения, который регенерируется в морфологически нормальные плодоносные растения, у которых затем измеряют дифференциальную устойчивость к выбранным гербицидам согласно описанию в разделе «Примеры» выше. Специалистам хорошо известны многие подходящие методы трансформации, в которых используют маркеры отбора, такие как канамицин, бинарные векторы, такие как векторы, полученные из агробактерии и регенерации растения, например, из листовых дисков табака. Дополнительно, контрольная популяция растений таким же образом трансформируется нуклеиновой кислотой, экспрессирующей контрольную TgA. Среднее значение и распределение уровней устойчивости к гербициду, характеризующих результаты первичной трансформации растения или его потомства, на которое влияют гербициды, описанное выше, рассчитывают обычным способом, учитывая повреждение растения, симптомы меристемного отбеливания и т.д., при различных концентрациях гербицидов. Эти данные могут быть выражены в виде, например, значений GR50, полученных из кривой зависимости «доза-эффект», где значение дозы отмечается на оси абсцисс, а на оси ординат отмечаются «процент погибших растений», «эффект гербицида», «количество молодых всходов» и т.д., где увеличение значений GR50 соответствует повышению уровня врожденной устойчивости экспрессированной TgA. Гербициды можно применять до всхода растений или после.

Еще одна цель настоящего изобретения относится к изолированной, рекомбинантной и/или химически синтезированной нуклеиновой кислоте, кодирующей мутированную TgA согласно описанию выше, при этом нуклеиновая кислота может содержать нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 1 или ее вариант или производное.

Примеры отличий в положениях аминокислоты включают, но не ограничиваются ими, одно или более из следующих:

аминокислота, соответствующая позиции 92, замещена любой другой аминокислотой;

аминокислота, соответствующая позиции 93, замещена любой другой аминокислотой;

аминокислота, соответствующая позиции 155, замещена любой другой аминокислотой;

аминокислота, соответствующая позиции 157, замещена любой другой аминокислотой;

В предпочтительном варианте осуществления, кодированная мутированная TriA является вариантом SEQ ID NO:2, который включает одну или более из следующих:

аминокислота, соответствующая позиции 92, не является Лейцином;

аминокислота, соответствующая позиции 93, не является Тирозином;

аминокислота, соответствующая позиции 155, не является Метионином;

аминокислота, соответствующая позиции 157, не является Фенилаланином;

В особенно предпочтительном варианте осуществления мутированная TriA, кодированная нуклеиновой кислотой по настоящему изобретению, содержит вариант SEQ ID NO: 2, в котором аминокислоты в положениях, соответствующих положениям 92, 93, 155, и 157 SEQ ID NO:2 замещены другими аминокислотами.

В особенно предпочтительном варианте осуществления кодированная мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Val, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном особенно предпочтительном варианте осуществления, кодированная мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Thr, и

аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu

В еще одном особенно предпочтительном варианте осуществления, клдированная мутированная TrtA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ala, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В еще одном особенно предпочтительном варианте осуществления, клдированная мутированная TrtA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которых:

аминокислота, соответствующая позиции 92, представляет собой Ser, и аминокислота, соответствующая позиции 93, представляет собой Leu, и аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Thr, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В соответствии с другими аспектами настоящее изобретение включает потомство или потомков растения, обладающего устойчивостью к гербицидам по настоящему изобретению, а также семена и клетки, которые получены из растений, обладающих устойчивостью к гербицидам по настоящему изобретению.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящим изобретением предоставляется потомство или потомки растения, которое, по меньшей мере, в некоторых своих клетках содержит полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растения, при этом промотор способен экспрессировать полипептид мутированной TrtA, кодированный указанным полинуклеотидом, причем указанное потомство или потомки растения, по меньшей мере, в некоторых своих клетках содержат рекомбинантный полинуклеотид, функционально связанный с промотором, при этом экспрессия полипептида мутированной TrtA придает указанному потомству или потомкам растения устойчивость к гербицидам.

В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения семена по настоящему изобретению предпочтительно обладают характеристиками устойчивости к гербицидам указанного устойчивого к гербицидам растения. В соответствии с другими вариантами осуществления изобретения семя способно развиваться в растение, содержащее, по меньшей мере, в некоторых своих клетках полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растения, при этом промотор способен экспрессировать полипептид мутированной Tg1A, кодируемый указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида мутированной Tg1A придает указанному растению устойчивость к гербицидам.

В некоторых вариантах осуществления из клеток растения по настоящему изобретению может быть регенерировано растение или часть растения. В других вариантах осуществления из клеток растения по настоящему изобретению растение или часть растения не может быть регенерировано. Примеры клеток, из которых не может быть регенерировано растение, включают, помимо прочего, эндосперм, семенную оболочку (теста и перикарпий) и корневой чехлик.

В еще одном варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется клетка растения или клетка, из которой может быть регенерировано растение, которое, по меньшей мере, в некоторых своих клетках содержит полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растения, при этом промотор способен экспрессировать полипептид Tg1A мутированной Tg1A, кодируемый указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида мутированной Tg1A придает указанному растению устойчивость к гербицидам, при этом указанная клетка растения содержит рекомбинантный полинуклеотид, функционально связанный с промотором.

В соответствии с другими вариантами осуществления настоящим изобретением предоставляется клетка растения, содержащая полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растения, при этом промотор способен экспрессировать полипептид мутированной Tg1A, кодируемый указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида мутированной Tg1A придает указанной клетке устойчивость к гербицидам.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к клетке растения, трансформированной нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид с мутированной Tg1A в соответствии с настоящим изобретением, причем экспрессия нуклеиновой кислоты в клетке растения приводит к повышению стойкости или устойчивости к гербициду по сравнению с клеткой растения дикого типа. Предпочтительно нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид с мутированной Tg1A, содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: а) полинуклеотида, как показано в SEQ ID NO: 1, или его варианта или производного; б) полинуклеотида, кодирующего полипептид, как показано в SEQ ID NO: 2, или его варианта или производного; с) полинуклеотида, содержащего, по меньшей мере, 60 непрерывных нуклеотидов любого из полинуклеотидов по пунктам а) или б); и d) полинуклеотида, смежного с любым полинуклеотидом по пунктам а) – с).

В соответствии с некоторыми аспектами настоящим изобретением предоставляется растительный продукт, полученный из растений, устойчивых к гербицидам. В некоторых вариантах осуществления примеры растительных продуктов включают, помимо прочего, зерно, масло и муку. В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения растительным продуктом является зерно растений (например, зерно пригодное для употребления в пищу или для переработки), растительное масло (например, масло пригодное для употребления в пищу или для получения биодизельного топлива) или растительная мука (например, мука пригодная для употребления в пищу).

В одном из вариантов осуществления предоставляется растительный продукт, полученный из растения или части растения, которые, по меньшей мере, в некоторых своих клетках содержат полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растения, при этом промотор способен экспрессировать полипептид мутированной Tg1A, кодированный указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида мутированной Tg1A придает указанному растению или части растения устойчивость к гербицидам.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к способу получения клетки трансгенного растения с повышенной стойкостью к гербициду по сравнению с клеткой растения дикого типа, включая трансформирование клетки растения кассетой экспрессии, содержащей полинуклеотид, функционально

связанный с промотором, функционирующим в клетках растения, при этом промотор способен экспрессировать полипептид с мутированной TrtA, кодированный указанным полинуклеотидом.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к способу получения трансгенного растения, включающему: (а) трансформирование клетки растения кассетой экспрессии, содержащей полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растения, при этом промотор способен экспрессировать полипептид с мутированной TrtA, кодированный указанным полинуклеотидом, и (b) получение из растительной клетки растения с повышенной стойкостью к гербициду.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящим изобретением предоставляется способ получения растений, обладающих устойчивостью к гербицидам. В одном из случаев осуществления указанный способ включает регенерирование растения из клетки растения, трансформированной с использованием полинуклеотида, функционально связанного с промотором, функционирующим в клетке, при этом промотор способен экспрессировать полипептид мутированной TrtA, кодированный указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида мутированной TrtA придает указанному растению устойчивость к гербицидам.

Термин «экспрессия/экспрессирование» или «экспрессия генов» означает транскрипцию специфического гена или генов или генного конструкта. Термин «экспрессия» или «экспрессия гена» в частности, означает транскрипцию гена или генов или генного конструкта в структурную РНК (rRNA, tRNA) или мРНК с последующей трансляцией последней в белок или без трансляции. Этот процесс включает транскрипцию ДНК и обработку полученного продукта мРНК.

Для получения желаемого эффекта, т.е. растений, устойчивых или стойких к гербицидам, описанных в настоящем изобретении, по меньшей мере, одну нуклеиновую кислоту подвергают сверхэкспрессии методами и способами, известными специалистам в данной области.

Термин «повышенная экспрессия» или «избыточная экспрессия», при использовании по тексту настоящего документа, означает любую форму экспрессии, которая добавляется к уровню экспрессии дикого типа. Методы

повышения экспрессии генов или генных продуктов описаны в документах в данной области и включают, например, сверхэкспрессию, которой способствуют соответствующие промоторы, усилители транскрипции или трансляции. Изолированные нуклеиновые кислоты, которые служат промоторами или усилительными элементами, могут быть введены в соответствующую позицию (обычно против хода транскрипции) негетерологичной формы полинуклеотида для повышающей регуляции экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей целевой полипептид. Например, эндогенные промоторы можно изменить в естественных условиях путем мутации, удаления и/или замещения (см. Kmiec, US 5,565,350; Zarling et al., WO9322443), или изолированные промоторы можно ввести в клетку растения в надлежащем направлении и на надлежащем расстоянии от гена настоящего изобретения для контроля экспрессии гена. Если необходима экспрессия полипептида, желательно включить полиаденильный участок 3'-конца на участке, кодирующем полинуклеотид. Полиаденильный участок можно получить из природного гена, набора других растительных генов или Т-ДНК. Добавляемая 3'-концевая последовательность может быть получена, например, из генов нопалин-синтазы или октопин-синтазы, или, предпочтительно, из другого растительного гена, или из любого другого эукариотического гена. Для увеличения количества готовой информации, которая накапливается в цитозоли, к 5' нетранслируемой области (UTR) или кодирующей последовательности частично кодирующей последовательности может быть также добавлена интронная последовательность. Включение связывающего интрона в транскрипционный элемент как в растительные, так и животные экспрессионные конструкторы повысило экспрессию генов на уровнях мРНК и белков до 1000-кратного уровня (Buchman and Berg (1988) *Mol. Cell biol.* 8: 4395-4405; Callis et al. (1987) *Genes Dev* 1:1183-1200). Такое интронное увеличение генной экспрессии обычно максимально возле 5'-конца транскрипционного элемента. Использование кукурузных интронов Adh1-S интрон 1, 2, и 6, интрон Bronze-1 известны специалистам. Для получения общей информации см.: *The Maize Handbook*, Chapter 116, Freeling and Walbot, Изд., Springer, N.Y. (1994).

При необходимости, нуклеотидные последовательности могут быть оптимизированы для повышенной экспрессии в трансформированном растении. Например, могут быть предоставлены кодирующие последовательности, которые

содержат предпочтительные для растений кодоны для повышения экспрессии в растении. Смотрите, например, Campbell and Gowri (1990) *Plant Physiol.*, 92: 1-11: обсуждение использования кодонов, предпочтительных для «хозяина». Способы получения предпочтительных для растений генов также известны специалистам из уровня техники. Смотрите, например, патенты США №№ 5,380,831 и 5,436,391, и Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498, включенные в настоящую заявку посредством ссылки.

Следовательно, нуклеиновые кислоты с мутированной TriA / TriA дикого типа по изобретению представлены в кассетах экспрессии для экспрессии в целевом растении. Кассета будет включать регуляторные последовательности, функционально связанные с нуклеотидной последовательностью с мутированной TriA по изобретению. Понятие «регуляторный элемент» при использовании по тексту настоящего документа относится к полинуклеотиду, способному регулировать транскрипцию функционально связанного полинуклеотида. Он включает, помимо прочего, промоторы, усилители, интроны, 5' UTR и 3' UTR. Под «функционально связан» подразумевают функциональная связь между промотором и второй последовательностью, причем последовательность промотора иницирует и способствует транскрипции последовательности ДНК, соответствующей второй последовательности. Обычно, «функционально связан» означает, что нуклеотидные последовательности, будучи связанными, являются смежными и, при необходимости, объединяют два участка кодирования белка, смежных и в одной рамке считывания. Кассета может также содержать, по меньшей мере, один дополнительный ген для котрансформации в организм. В альтернативном случае, дополнительный ген(ы) может быть представлен в нескольких кассетах экспрессии.

Такая кассета экспрессии предусмотрена со множеством сайтов рестрикции для вставки последовательности нуклеиновой кислоты с мутированной TriA/TriA дикого типа, которая будет подвержена транскрипционной регуляции регуляторных участков. Кассета экспрессии может также содержать селективируемый маркерный ген. Кассета экспрессии по настоящему изобретению будет включать по направлению транскрипции от 5'- к 3'-концу область инициации трансляции или транскрипции (т.е. промотор), мутированную TriA/TriA дикого типа, кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты по настоящему

изобретению и участок терминации транскрипции или трансляции (т.е. участок терминации), являющийся функциональным в растениях. Промотор может быть нативным или аналогическим, инородным или гетерологическим, по отношению к растению-хозяину и/или к нуклеотидной последовательности с мутированной TriA/TriA дикого типа по изобретению. Также промотор может представлять собой природную последовательность или, альтернативно, синтетическую последовательность. Когда промотор является «инородным» или «гетерологическим» по отношению к растению-хозяину, подразумевают, что промотор отсутствует в нативном растении, в которое его ввели. Когда промотор является «инородным» или «гетерологическим» по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты с мутированной TriA/TriA дикого типа в настоящем изобретении, подразумевают, что промотор не является нативным или природным промотором для функционально связанной последовательности нуклеиновой кислоты с мутированной TriA/TriA дикого типа по настоящему изобретению. Согласно использованию в настоящем документе, химерный ген содержит кодирующую последовательность, функционально связанную с участком инициации транскрипции, который является гетерологическим по отношению к кодирующей последовательности. Так как предпочтительно экспрессировать нуклеиновые кислоты настоящего изобретения с мутированной TriA/TriA дикого типа с помощью гетерологических промоторов, можно использовать нативные промоторные последовательности. Такие конструкции изменяют уровни экспрессии белка с мутированной TriA/TriA дикого типа в растении или клетке растения. Таким образом, изменяется фенотип растения или его клетки.

Участок терминации может быть нативным с участком инициации транскрипции, нативным с функционально связанной целевой последовательностью с мутированной TriA/TriA дикого типа, нативным с растением-хозяином или может быть получен из другого источника (т.е. может быть инородным или гетерологическим к промотору, целевой последовательности нуклеиновой кислоты с мутированной TriA/TriA дикого типа, растению-хозяину или их комбинации). Подходящие участки терминации можно получить из Ti-плазмиды бактерий *A. tumefaciens*, такие как участки терминации октопин-синтазы и нопалин-синтазы. См. также Гурино (Guerineau) и др. (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 ген или гены могут быть оптимизированы для повышенной экспрессии в трансформированном растении. Другими словами, гены можно синтезировать с помощью предпочтительных для растений кодонов для улучшения экспрессии. Смотрите, например, Campbell and Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92: 1-11: обсуждение использования кодонов, предпочтительных для «хозяина». Существуют методы для синтеза растительно-предпочтительных генов. Смотрите, например, патенты США №№ 5,380,831, и 5,436,391, и Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498, включенные в настоящую заявку посредством ссылки.

Таким образом настоящее изобретение предоставляет кассету экспрессии, включающую молекулу нуклеиновой кислоты с мутированной TrtA по настоящему изобретению, а также промотор, функционирующий в клетках растения.

В предпочтительном варианте осуществления промотор является промотором, специфическим в отношении корня, или промотором, усиленным в отношении корня.

В особенно предпочтительном варианте осуществления промотор является промотором, специфическим в отношении корня, или промотором, усиленным в отношении корня, из *Glycine max.* (например, p-Glyma04g34080, смотрите Примеры 8 и 9)

Еще более предпочтительно, промотор содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 32.

Так как полинуклеотиды по изобретению могут быть использованы в качестве селективируемых маркерных генов для трансформации растений, кассеты экспрессии изобретения могут включать еще один селективируемый маркерный ген для селекции трансформированных клеток. Селективируемые маркерные гены, включая гены по настоящему изобретению, используют для селекции трансформированных клеток или тканей. Маркерные гены включают, помимо прочего, гены, кодирующие стойкость к антибиотикам, такие как гены, кодирующие неомицин фосфотрансферазу II (NEO) и гидромицин фосфотрансферазу (HPT), а также гены, имеющие стойкость к гербицидным соединениям, таким как

глюфосинат аммоний, бромоксинил, имидазолиноны и 2,4-дихлорофеноксиацетат (2,4-D). См., в основном, 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*, стр. 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) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; 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; Bairn 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 Struct. Biol* 10: 143-162; Degenkolb et al (1991) *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1591-1595; Kleinschmidt et al (1988) *Biochemistry* 27: 1094-1104; Bonin (1993) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; 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*, Том 78 (Springer-Verlag, Берлин); Gill et al (1988) *Nature* 334:721-724. Эти сведения включены в настоящую заявку посредством ссылки. Перечень вышеперечисленных маркерных генов не является исчерпывающим. Любой селектируемый маркерный ген может использоваться в настоящем изобретении.

Также, известно, что дополнительные модификации последовательностей улучшают генную экспрессию в клетке-хозяине. Они включают удаление последовательностей, кодирующих ложные сигналы полиаденилирования, сигналы участка сплайсирования экзонов и интронов, повторения, подобные транспозонам, и другие так же четко характеризующиеся последовательности, которые могут быть разрушительными по отношению к генной экспрессии. GC-состав последовательности может быть скорректирован до уровней, средних для указанной клетки-хозяина, что рассчитывается с помощью известных генов, экспрессированных в клетке-хозяине. Также, при необходимости, последовательности могут быть модифицированы таким образом, чтобы в них не было прогнозных шпичечных вторичных мРНК структур. Нуклеотидные последовательности для улучшения генной экспрессии могут также использоваться в векторах экспрессии

растения. Они включают, например, интроны кукурузы *Adhl*, интрон гена *Adhl* 1, 2 и 6 (Callis et al. *Genes and Development* 1: 1183-1200, 1987), и ведущие последовательности, (W-последовательность) из вируса табачной мозаики (ВТМ), вируса хлорозной пятнистости кукурузы (ВХПК) и вируса мозаики люцерны (Gallie et al. *Nucleic Acid Res.* 15:8693-8711, 1987 и Skuzeski et al. *Plant Mol. Biol.* 15:65-79, 1990). Первый интрон из «сморщенного»-1 локуса кукурузы демонстрирует повышение экспрессии генов в конструктах химерного гена. В патентах США №№ 5,424,412 и 5,593,874 описано использование специфических интронов в конструктах генной экспрессии, и в Gallie et al. (*Plant Physiol.* 106:929-939, 1994) также доказывается, что интроны могут быть использованы для регулирования генной экспрессии на тканеспецифической основе. Для дальнейшего улучшения или оптимизации генной экспрессии, векторы экспрессии растения по настоящему изобретению могут также содержать последовательности ДНК с участками MARs (участки прикрепления к матриксу). Растительные клетки, трансформированные такими модифицированными системами экспрессии, могут в дальнейшем проявить сверхэкспрессию или конститутивную экспрессию нуклеотидной последовательности изобретения.

Изобретение также предоставляет изолированный вектор рекомбинантной экспрессии, включающий кассету экспрессии с нуклеиновой кислотой с мутированной *TriA/TriA* дикого типа в соответствии с описанием выше, причем экспрессия вектора в клетке-хозяине приводит к повышению устойчивости к гербициду по сравнению с клеткой-хозяином дикого типа. В данном контексте, понятие «вектор» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Одним из видов вектора является «плазида», которая относится к сегментам двухцепочечной петли ДНК, которые можно лигировать в вирусный геном. Еще одним видом вектора является вирусный вектор, где дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они были внесены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальное происхождение репликации, и эписомные векторы, относящиеся к млекопитающим). Другие векторы (например, не эписомные векторы, относящиеся к млекопитающим) интегрируются в геном клетки-хозяина при внесении в клетку-хозяина и реплицируются вместе с геномом-

хозяином. Более того, определенные векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы, в данном контексте, называют «векторами экспрессии». Обычно, используемые векторы экспрессии в технологии рекомбинантных ДНК принимают форму плазмид. В настоящем описании изобретения, понятие «плазмида» и «вектор» являются взаимозаменяемыми, так как плазмиду чаще всего используют в форме вектора. Тем не менее, изобретение включает и другие формы экспрессионных векторов, такие как вирусные векторы (например, ретровирус с дефективной репликацией, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), выполняющих те же функции.

Рекомбинантные векторы экспрессии по изобретению включают нуклеиновую кислоту по изобретению в форме, подходящей для экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине, что означает, что рекомбинантные векторы экспрессии включают одну или несколько регуляторных последовательностей, выбранных на основе клеток хозяина, которые должны использоваться в экспрессии, которая функционально связана с нуклеотидной последовательностью для экспрессии. Регуляторные последовательности включают последовательности, которые направляют конститутивную экспрессию нуклеотидной последовательности во многих видах клеток-хозяев и последовательности, которые направляют конститутивную экспрессию нуклеотидной последовательности только в определенных клетках-хозяевах или при определенных условиях. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что вид вектора экспрессии может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина для трансформации, уровень экспрессии желаемого полипептида и т.д. Векторы экспрессии по изобретению могут быть введены в клетки-хозяева для производства таким способом полипептидов или пептидов, включая полипептиды или пептиды слияния, закодированных нуклеиновыми кислотами, согласно настоящему документу (например, полипептиды с мутированной TgA, полипептиды слияния и т.д.).

Векторы экспрессии могут также содержать 5'-концевые лидерные последовательности в конструкторе экспрессии. Такие лидерные последовательности могут улучшать трансляцию. Трансляционные лидерные последовательности хорошо известны специалистам в данной области и включают: лидерные последовательности пикорнавируса, например, EMCV лидерные последовательности (некодирующий участок 5'-конца энцефаломиокардита)

(Elroy-Stein et al. (1989) PNAS, 86:6126- 6130); лидерные последовательности потивируса, например, лидер вируса гравировки табака (TEV) (Gallie et al. (1995) Gene 165(2):233-238), лидерные последовательности вируса карликовой мозаики кукурузы (MDMV) (Virology 154:9-20), и белок, связывающий тяжелую цепь иммуноглобулина (BiP) (Macejak et al. (1991) Nature 353:90-94); нетранслируемую лидерную последовательность из вирусного белка мРНК вируса мозаики люцерны (AMV RNA 4) (Jobling et al. (1987) Nature 325:622-625); лидерная последовательность вируса табачной мозаики (TMV) (Gallie et al. (1989) в Molecular Biology of RNA, изд. Cech (Liss, Нью-Йорк), стр. 237-256); и лидерную последовательность вируса хлорозной пятнистости кукурузы (MCMV) (Lommel et al. (1991) Virology 81 :382- 385). Смотрите также Della-Cioppa et al. (1987) Plant Physiol. 84:965-968.

Также могут быть использованы другие методы, улучшающие трансляцию, например, интроны и т.п. При подготовке вектора экспрессии, различные фрагменты нуклеиновых кислот можно изменить таким образом, чтобы получить нуклеотидные последовательности с необходимой ориентацией и, при необходимости, рамкой чтения. С этой целью могут быть использованы адаптеры или линкеры для соединения фрагментов нуклеиновых кислот или другие манипуляции для обеспечения подходящих участков рестрикции, удаления избыточных нуклеиновых кислот, удаление сайтов рестрикции и т.п. Для этих целей, можно использовать мутагенез *in vitro*, восстановление праймеров, рестрикцию, ренатурацию, повторную замещение, например, транзиции и трансверсии.

При практическом применении изобретения может использоваться несколько промоторов. Промоторы можно выбрать в зависимости от желаемого результата. Нуклеиновые кислоты могут комбинироваться с конститутивными, предпочтительно тканевыми или другими промоторами для экспрессии в растениях.

Конститутивные промоторы включают, например, ядерный промотор промотора Rsyn7 и другие конститутивные промоторы, описанные в WO 99/43838 и патенте США № 6,072,050; ядерный промотор CaMV 35S (Odell et al. (1985) Nature 313:810-812); рисовый актин (McElroy et al. (1990) Plant Cell 2: 163-171); убиквитин (Christensen et al. (1989) Plant Mol. Biol. 12:619-632 и Кристенсен (Christensen) и др.

(1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675-689); pEMU (Last et al. (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81:581- 588); MAS (Velten et al. (1984) *EMBO J.* 3:2723- 2730); ALS промотор (патент США № 5,659,026), и аналогичные промоторы. Другие конститутивные промоторы включают, например, описанные в патентах США №№ 5,608,149; 5,608,144; 5,604,121; 5,569,597; 5,466,785; 5,399,680; 5,268,463; 5,608,142; и 6,177,611.

Для нацеливания повышенной экспрессии в определенной ткани растения можно использовать тканеспецифичные промоторы. Такие тканеспецифические промоторы включают, помимо прочего, промоторы специфические к листьям, корням, семенам и стеблям. Некоторые примеры тканеспецифических промоторов описаны, например, 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; илиozco ef al. (1993) *Plant Mol Biol.* 23(6): 1129-1138; Matsuoka et al. (1993) *Voc Natl. Acad. Sci США* 90(20):9586-9590; и Guevara-Garcia et al. (1993) *Plant J* 4(3):495-505. Промоторы при необходимости можно модифицировать таким образом, чтобы экспрессия была меньше.

В предпочтительном варианте осуществления промотор является промотором, специфическим в отношении корня, или промотором, усиленным в отношении корня.

В особенно предпочтительном варианте осуществления, промотор содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 32.

В некоторых вариантах осуществления целевые нуклеиновые кислоты могут быть нацелены в хлоропласт для экспрессии. Таким образом, там, где целевая нуклеиновая кислота вставляется в хлоропласт не напрямую, вектор экспрессии будет дополнительно содержать последовательность, направленную в хлоропласт, содержащую нуклеотидную последовательность, которая кодирует хлоропластовый транзитный пептид, для направления целевого генного продукта в хлоропласты. Такие транзитные пептиды хорошо известны специалистам. Относительно последовательностей, нацеленных в хлоропласт, «функционально

связанный» означает, что нуклеотидная последовательность, кодирующая транзитный пептид (т.е. последовательность, нацеленная в хлоропласт), связана с целевой кодирующей последовательностью по изобретению так, что две последовательности являются смежными и находятся в одной рамке считывания. Смотрите, например, Von Heijne et al. (1991) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 104-126; Clark et al. (1989) *J Biol. Chem.* 264:17544-17550; Della-Cioppa et al. (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968; Romer et al. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196: 1414-1421; и Shah et al. (1986) *Science* 233:478-481. Например, с аминокислотной последовательностью полипептида TriA по изобретению можно соединить любой известный хлоропластный транзитный пептид путем функционального связывания последовательности, нацеленной в хлоропласт, с 5'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей указанный полипептид TriA.

Последовательности, направленные на хлоропласт, известны специалистам и включают хлоропластную субъединицу рибулоза-1,5-бифосфат карбоксилаза (Rubisco) (de Castro Silva Filho et al. (1996) *Plant Mol. Biol.* 30:769-780; Schnell et al. (1991) *J Biol. Chem.* 266(5):3335-3342); EPSPS (Archer et al. (1990) *J Bioenerg. Biomemb.* 22(6):789-810); триптофан синтазы (Zhao et al. (1995) *J Biol. Chem.* 270(11):6081-6087); пластоцианин (Lawrence et al. (1997) *J Biol. Chem.* 272(33):20357-20363); хоризмат синтазы (Schmidt et al. (1993) *J Biol. Chem.* 268(36):27447-27457); и светособирающий белок, связывающий хлорофилл a/b (LHBP) (Lamppa et al. (1988) *J Biol. Chem.* 263: 14996-14999). См. Также Фон Хайжне (Von Heijne) и др. (1991) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 104- 126; Clark et al. (1989) *J Biol. Chem.* 264: 17544-17550; Della-Cioppa et al. (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968; Romer et al. (1993) *Biochem Biophys. Res. Commun.* 196: 1414-1421; и Shah et al. (1986) *Science* 233:478-481.

Методы трансформации хлоропластов хорошо известны специалистам. Смотрите, например, Svab et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8526-8530; Svab and Maliga (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:913-917; Svab and Maliga (1993) *EMBO J.* 12:601-606. Метод основывается на внедрении с помощью генной пушки ДНК, содержащей селектируемый маркер, и нацеливании ДНК в пластидный геном путем гомологической рекомбинации. Также пластидную Трансформация может быть осуществлена с помощью трансактивации нефункционирующего трансгена, находящегося в пластиде, путем

тканеспецифической экспрессии РНК полимеразы, закодированной в ядре и направленной в пластиду. О такой системе сообщается в McBride et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. США* 91 :7301- 7305.

Целевые нуклеиновые кислоты, нацеливаемые в хлоропласт, можно оптимизировать для экспрессии в хлоропласте, для учета разницы в использовании кодона между зародышем растения и этой органеллой. Таким образом, целевые нуклеиновые кислоты можно синтезировать с помощью кодонов предпочтительных для хлоропластов. Смотрите, например, патент США № 5,380,831, включенный в настоящую заявку посредством ссылки.

Доступны различные трансформационные векторы и способы трансформации растений. Смотрите, например, An, G. et al. (1986) *Plant Physiol.* 81 :301-305; Fry, J., et al. (1987) *Plant Cell Rep.* 6:321-325; Block, M. (1988) *Theor. Appl. Genet.* 16: 161 -1 1 A; Hinchey, et al. (1990) *Stadler. Genet. Symp.* 2032\2.203-2\2; Cousins, et al. (1991) *Aust. J. Plant Physiol.* 18:481-494; Chee, P. P. and Slightom, J. L. (1992) *Gene* 118:255-260; Christou, et al. (1992) *Trends. Biotechnol.* 10:239-246; Halluin, et al. (1992) *Bio/Technol.* 10:309-314; Dhir, et al. (1992) *Plant Physiol.* 99:81-88; Casas et al. (1993) *Proc. Nat. Acad. Sci. США* 90: 11212-11216; Christou, P. (1993) *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*; 29P.119-124; Davies, et al. (1993) *Plant Cell Rep.* 12: 180-183; Dong, J. A. and Mchughen, A. (1993) *Plant Sci* 91 : 139-148; Franklin, C. I. and Trieu, T. N. (1993) *Plant. Physiol.* 102: 167; Golovkin, et al. (1993) *Plant Sci* 90:41-52; Guo Chin Sci Bull. 38:2072-2078; Asano, et al. (1994) *Plant Cell Rep.* 13; Ayeres N. M. and Park, W. D. (1994) *Crit. Rev. Plant. Sci.* 13:219-239; Barcelo, et al. (1994) *Plant. J.* 5:583-592; Becker, et al. (1994) *Plant. J.* 5:299-307; Borkowska et al. (1994) *Acta. Physiol Plant.* 16:225-230; Christou, P. (1994) *Agro. Food. Ind. Hi Tech.* 5: 17-27; Eapen et al. (1994) *Plant Cell Rep.* 13:582-586; Hartman, et al. (1994) *Bio-Technology* 12: 919923; Ritala, et al. (1994) *Plant. Mol. Biol.* 24:317-325; и Wan, Y. C. and Lemaux, P. G. (1994) *Plant Physiol.* 104:3748.

В некоторых вариантах осуществления способ по изобретению включает введение в растение конструктора полинуклеотида. Термин «введение» означает внедрение конструктора полинуклеотида в растение таким образом, что конструктор получает доступ к внутренней части клетки растения. Способы по изобретению не зависят от конкретного метода введения конструктора полинуклеотида в растение, за исключением того, что введение должно осуществляться таким образом, чтобы

конструкт полинуклеотида получал доступ к внутренней части, по меньшей мере, одной клетки растения. Способы введения конструктов полинуклеотида в растения известны специалистам и включают, помимо прочего, способы стабильной трансформации, транзиентной трансформации и вирус-опосредованные способы. Понятия «введение» и «трансформация» по тексту настоящего документа обозначают здесь перенос экзогенного полинуклеотида в клетку-хозяина, независимо от способа переноса. Ткань растения, способная к дальнейшему клонovому размножению, путем органогенеза либо эмбриогенеза, может быть трансформирована с регенерацией из нее генетического конструкта по настоящему изобретению и целого растения. Выбор определенной ткани будет зависеть от доступных и наиболее подходящих для трансформации определенного вида систем клонovого размножения. Образцы целевых тканей включают листовые диски, пыльцу, зародыши, семядоли, гипокотили, мегагаметофиты, ткани каллюсов, существующую меристемную ткань (например, верхушечную меристему, пазушные почки и корневые меристемы) и индуцированную меристемную ткань (например, семядольную меристему и меристему гипокотилия). Полинуклеотид может быть внедрен в клетку-хозяина на время или постоянно и может сохраняться в неизменном виде, например, в виде плаزمиды. Либо он может быть интегрирован в геном хозяина. Полученная трансформированная растительная клетка может использоваться для регенерации трансформированного растения, способами, которые известны специалистам в данной области.

Под термином «стабильная трансформация» подразумевают то, что при введении в растение конструкт полинуклеотида встраивается в геном растения и способен наследоваться его потомками. Под термином «транзиентная трансформация» подразумевают то, что при введении в растение конструкт полинуклеотида не встраивается в геном растения.

Для трансформации растений и клеток растения, нуклеотидные последовательности по изобретению вставляются с использованием стандартных методов в любой известный специалистам вектор, который может использоваться для экспрессии нуклеотидных последовательностей в растении или клетке растения. Выбор вектора зависит от предпочтительного метода трансформации и целевого вида растений, который подвергают трансформации. В одном из вариантов осуществления изобретения кодирующая нуклеотидная

последовательность функционально связана растительным промотором, например, с промотором, который известен специалистам как промотор, обеспечивающий высокий уровень экспрессии в клетке растения, и затем этот конструкт вводится в клетку растения, которую подвергают воздействию гербицидов, затем осуществляют регенерацию трансформированного растения. В некоторых вариантах осуществления трансформированное растение обладает устойчивостью к такому уровню воздействия гербицидов, который привел бы к гибели или существенному повреждению растения, регенерированного из нетрансформированной клетки. Настоящий способ может применяться к любым видам или культурам растений.

В целом, специалистам известны методологии конструирования растительных векторов экспрессии и введения чужеродных нуклеиновых кислот в растение. Например, чужеродные ДНК могут быть введены в растения с использованием опухолеиндуцирующих (Ti) плазмидных векторов. Другие способы, используемые для введения чужеродной ДНК, включают использование PEG-опосредованную трансформацию протопласта, электропорацию, использование микроигл для микроинъекций, и биобаллистику или бомбардировку микрочастицами для прямого поглощения ДНК. Такие способы известны специалистам из уровня техники. (патент США № 5,405,765 - Vasil et al.; Bilang et al (1991) *Gene* 100: 247-250; Scheid et al., (1991) *Mol. Gen. Genet.*, 228: 104- 112; Guerche et al., (1987) *Plant Science* 52: 111-116; Neuhaus et al., (1987) *Theor. Appl. Genet.* 75: 30-36; Klein et al., (1987) *Nature* 327: 70-73; Howell et al., (1980) *Science* 208: 1265; Horsch et al., (1985) *Science* 227: 1229-1231; DeBlock et al., (1989) *Plant Physiology* 91 : 694-701; *Methods for Plant Molecular Biology* (Weissbach and Weissbach, изд.) Academic Press, Inc. (1988) и *Methods in Plant Molecular Biology* (Schuler and Zielinski, изд.) Academic Press, Inc. (1989).

Прочие пригодные способы введения нуклеотидной последовательности в клетки растения включают микроинъекции в соответствии с описанием, например, в Crossway et al. (1986) *Biotechniques* 4:320-334, электропорацию в соответствии с описанием, например, в Riggs et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5602- 5606, агробактериальная трансформация, в соответствии с описанием, например, в Townsend et al., патенте США № 5,563,055, Zhao et al., патенте США № 5,981,840, прямой перенос генов, в соответствии с описанием, например, Paszkowski et al.

(1984) EMBO J. 3:2717-2722, и баллистическое ускорение частиц в соответствии с описанием, например, в патентах США №№ 4,945,050; 5,879,918; 5,886,244; и 5,932,782; Tomes et al. (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment," в Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods, изд. Gamborg and Phillips (Springer- Verlag, Берлин); McCabe et al. (1988) Biotechnology 6:923-926; и Led transformation (WO 00/28058). Также см. 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) PNAS, 85:4305-4309 (маис); Klein et al., (1988) Biotechnology 6:559-563 (маис); патенты США №№ 5,240,855; 5,322,783; и 5,324,646; Tomes et al., (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment," в Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods, изд. Gamborg (Springer-Verlag, Берлин) (маис); 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 (Лондон) 311 :763-764; Bowen et al, патент США № 5,736,369 (зерновые культуры); Bytebier et al, (1987) PNAS 84:5345-5349 (Лилейные); De Wet et al., (1985) в The Experimental Manipulation of Ovule Tissues, изд. Chapman et al, (Longman, Нью-Йорк), стр. 197-209 (пыльца); Каепплер et al., (1990) Plant Cell Reports 9:415-418 и Каепплер et al., (1992) Theor. Apph Genet. 84:560-566 (вискер-опосредованная 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 (кукуруза via Agrobacterium tumefaciens); каждый из которых включен в настоящую заявку посредством ссылки.

Трансгенные растения, включая трансгенные сельскохозяйственные культуры, предпочтительно получают путем агробактериальной трансформации. Предпочтительный способ трансформации – это трансформация в полевых условиях. Для этой цели можно позволить агробактериям воздействовать на семена растения или произвести инокуляцию меристемы растения агробактериями. Для целей настоящего изобретения было признано особенно целесообразным, чтобы

суспензия трансформированных агробактерий воздействовала на целое растение или на примордий цветка. Затем происходит развитие растения до получения семян обработанного растения (Clough and Bent, *Plant J.* (1998) 16, 735–743). Способы трансформации риса с помощью *Agrobacterium* включают известные способы трансформации риса, например, описанные в любом из следующих источников: European patent application EP 1198985 A1, Aldemita and Hodges (*Planta* 199: 612-617, 1996); Chan et al. (*Plant Mol Biol* 22 (3): 491-506, 1993), Hiei et al. (*Plant J* 6 (2): 271-282, 1994), данные документы включены в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки. В случае трансформации кукурузы, предпочтительно используют способ, описанный в работе Ishida et al. (*Nat. Biotechnol* 14(6): 745-50, 1996) или Frame et al. (*Plant Physiol* 129(1): 13-22, 2002), данные документы включены в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки. Указанные методы также описаны, например, в B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, в: *Transgenic Plants*, Том 1, Engineering and Utilization, изд. S.D. Kung and R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 и в Potrykus *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991) 205-225). Нуклеиновые кислоты или конструктор, подлежащий экспрессии, предпочтительно клонируются в вектор, который может использоваться для трансформации *Agrobacterium tumefaciens*, например, pBin19 (Bevan et al., *Nucl. Acids Res.* 12 (1984) 8711). Агробактерии, трансформированные таким вектором, могут затем использоваться известным способом для трансформации растений, например, растений, используемых в качестве модели, например, *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* в рамках настоящего изобретения не считается сельскохозяйственной культурой), или сельскохозяйственных культур, таких как, например, табак, путем, например, погружения дробленых или рубленых листьев в агробактериальные растворы и затем культивирования их в подходящей среде. Трансформация растений посредством *Agrobacterium tumefaciens* описана, например, Höfgen and Willmitzer в *Nucl. Acid Res.* (1988) 16, 9877 или известна, помимо прочего, из F.F. White, *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*; в *Transgenic Plants*, Том 1, Engineering and Utilization, изд. S.D. Kung and R. Wu, Academic Press, 1993, стр. 15-38.

Одним из методов трансформации, известных специалистам, является погружение цветущего растения в раствор *Agrobacteria*, причем *Agrobacteria* содержат нуклеиновую кислоту TrtA, а затем выращивание трансформированных

гамет. Трансформацию растения с помощью *Agrobacterium* можно осуществить, используя, например, the GV3101(pMP90) (Koncz and Schell, 1986, Mol. Gen. Genet. 204:383-396) или LBA4404 (Clontech), штаммы *Agrobacterium tumefaciens*. Трансформация может быть осуществлена с помощью стандартных методов трансформации и регенерации (Deblaere et al., 1994, Nucl. Acids. Res. 13:4777-4788; Gelvin, Stanton B. and Schilperoort, Robert A, Plant Molecular Biology Manual, 2-ое Изд. - Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995. - в Sect., Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R. and Thompson, John E., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton: CRC Press, 1993 360 S., ISBN 0-8493-5164-2). Например, семена рапса могут быть трансформированы с помощью трансформации семядоли или гипокотилия (Moloney et al., 1989, Plant Cell Report 8:238-242; De Block et al., 1989, Plant Physiol. 91:694-701). Использование антибиотиков для *Agrobacterium* и отбор растений зависит от бинарного вектора и штамма *Agrobacterium*, используемых для трансформации. При отборе семян рапса обычно используют канамицин в качестве селектируемого растительного маркера. Перенос генов с помощью *Agrobacterium* в лен можно осуществить с помощью, например, метода, описанного Mlynarova et al., 1994, Plant Cell Report 13:282-285. Дополнительно, трансформация сои может быть осуществлена с помощью, например, метода, описанного в Европейском патенте № 0424 047, патенте США № 5,322,783, Европейском патенте № 0397 687, патенте США № 5,376,543, или патенте США № 5,169,770. Трансформация кукурузы может быть осуществлена с помощью бомбардировки частицами, поглощения ДНК посредством полиэтиленгликоля или метода, использующего карбидно-кремниевое волокно. (Смотрите, например, Freeling and Walbot "The maize handbook" Springer Verlag: Нью-Йорк (1993) ISBN 3-540-97826-7). Конкретный пример трансформации кукурузы описан в патенте США № 5,990,387, а конкретный пример трансформации пшеницы – в международной заявке на патент № WO 93/07256.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды по настоящему изобретению могут быть введены в растения путем контакта растений с вирусами или вирусными нуклеиновыми кислотами. Обычно такие способы включают введение конструкта полинуклеотида по изобретению в вирусную молекулу ДНК или РНК. Установлено, что полипептиды по изобретению могут изначально быть синтезированы как часть вирусного полипротеина, который затем может

обрабатываться путем протеолиза *in vivo* или *in vitro* для получения целевого рекомбинантного полипептида. Также, установлено, что промоторы по изобретению также включают промоторы, используемые для транскрипции вирусными РНК-полимеразами. Способы введения конструктора полинуклеотида в растение и экспрессии кодированного в нем белка с использованием вирусных молекул ДНК и РНК известны специалистам. Смотрите, например, патенты США №№ 5,889,191, 5,889,190, 5,866,785, 5,589,367 и 5,316,931; включенные в настоящую заявку посредством ссылки. Трансформированные клетки могут развиваться в растения в соответствии с обычными способами. Смотрите, например, McCormick et al (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Затем такие растения могут выращиваться и опыляться либо с использованием такой же трансформированной линии, либо других линий, после чего может идентифицироваться гибрид с конститутивной экспрессией целевой фенотипической характеристикой. Могут быть выращены два или более поколений для того, чтобы обеспечить сохранение и наследование целевой фенотипической характеристики, а затем может производиться сбор семян для того, чтобы обеспечить достижение экспрессии целевой фенотипической характеристики.

Настоящее изобретение может быть использовано для трансформации любых видов растений, включая, помимо прочего, однодольные и двудольные растения. Примеры целевых видов растений включают, помимо прочего, кукурузу или маис (*Zea mays*), виды рода *Brassica* (например, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), в частности, те виды рода *Brassica*, которые можно использовать при производстве масла из семян, люцерны (*Medicago sativa*), рис (*Oryza sativa*), рожь (*Secale cereale*), сорго (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), просо, например, пеннисетум сизый (*Pennisetum glaucum*), просо обыкновенное (*Panicum miliaceum*), просо итальянское (*Setaria italica*), просо пальчатое (*Eleusine coracana*)), подсолнечник (*Helianthus annuus*), сафлор (*Carthamus tinctorius*), пшеница (*Triticum aestivum*, *T. Turgidum* ssp. *durum*), соя (*Glycine max*), табак (*Nicotiana tabacum*), картофель (*Solanum tuberosum*), арахис (*Arachis hypogaea*), хлопок (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), батат (*Ipomoea batatas*), кассава (*Manihot esculenta*), кофе (виды рода *Coffea*), кокос (*Cocos nucifera*), ананас (*Ananas comosus*), citrusовые деревья (виды рода *Citrus*), cocoa (*Theobroma cacao*), чай (*Camellia sinensis*), банан (виды рода *Musa*), авокадо (*Persea americana*), инжир (*Ficus casica*), гуава (*Psidium guajava*),

манго (*Mangifera indica*), оливы (*Olea europaea*), папайя (*Carica papaya*), кешью (*Anacardium occidentale*), макадамия (*Macadamia integrifolia*), миндаль (*Prunus amygdalus*), сахарная свекла (*Beta vulgaris*), сахарный тростник (виды рода *Saccharum*), овес, ячмень, овощи, декоративные растения и хвойные деревья. Предпочтительно, растения по настоящему изобретению являются сельскохозяйственными культурами (например, подсолнечником, видами рода *Brassica*, хлопком, сахарной свеклой, соей, арахисом, люцерной, сафлором, табаком, кукурузой, рисом, пшеницей, рожью, ячменем, тритикале, сорго, просо, и т.д.).

В дополнение к трансформации соматических клеток, которые затем регенерируются в целое растение, существует возможность трансформации клеток растительных меристем, в частности, тех клеток, которые становятся гаметами. В данном случае развитие трансформированных гамет происходит естественным путем, с образованием трансгенных растений. Так, например, семена *Arabidopsis* обрабатывают агробактериями и из развивающихся растений получают семена, определенное количество которых являются трансформированными, т.е. трансгенными [Feldman, KA and Marks MD (1987) *Mol Gen Genet* 208:274-289; Feldmann K (1992). In: C Koncz, N-H Chua and J Shell, изд., *Methods in Arabidopsis Research*. Word Scientific, Singapore, стр. 274-289]. Альтернативные способы основаны на повторяющемся удалении соцветий и выращивании области вырезания в центре розетки с трансформированными агробактериями, таким образом, трансформированные семена могут быть получены на более поздних сроках (Chang (1994). *Plant J.* 5: 551-558; Katavic (1994). *Mol Gen Genet*, 245: 363-370). Однако особенно эффективным является способ вакуум-инfiltrации с такими модификациями как способ «обмакивания цветков в раствор». В случае вакуум-инfiltrации *Arabidopsis*, целые растения обрабатываются под сниженным давлением суспензией агробактерий [Bechthold, N (1993). *C R Acad Sci Paris Life Sci*, 316: 1194-1199], тогда как в случае протокола, называемого «floral-dip» (обмакивание цветков в раствор) развивающаяся цветочная ткань инкубируется с использованием обработанной сурфактантом агробактериальной суспензии suspension [Clough, SJ and Bent AF (1998) *The Plant J.* 16, 735-743]. В обоих случаях собирается определенное количество трансгенных семян, данные семена отличаются от нетрансгенных семян, тем, что их выращивают в вышеописанных селекционных условиях. Кроме того, устойчивая трансформация

пластидов является предпочтительной, так как пластиды наследуются по материнской линии, следовательно, для большинства культур сокращается или исключается риск трансгенного потока через пыльцу. Трансформация хлоропластного генома обычно достигается благодаря процессу, схематически описанному в Klaus et al., 2004 [Nature Biotechnology 22 (2), 225-229]. Последовательности, подлежащие трансформации, клонируются вместе с геномом селективируемого маркера между фланкирующими последовательностями, которые являются гомологическими по отношению к геному хлоропласта. Данные гомологические фланкирующие последовательности попадают в пластом путем прямой специфической интеграции. Пластидная трансформация описана для многих видов растений, общий обзор которой дан в Bock (2001) Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. J Mol Biol. 2001 Sep 21; 312 (3):425-38 или в работе Maliga, P (2003) «Progress towards commercialization of plastid transformation technology», Trends Biotechnol. 21, 20-28. Результатом дальнейшего биотехнологического развития стали пластидные трансформанты без маркеров, которые могут быть получены переходным коинтегрированным геном-маркером (Klaus et al., 2004, Nature Biotechnology 22(2), 225-229). Генетически модифицированные клетки растений могут быть регенерированы с помощью любых способов, известных специалистам. Подходящие способы можно найти в вышеперечисленных публикациях S.D. Kung and R. Wu, Potrykus или Höfgen and Willmitzer.

Обычно после трансформации клетки растений или группы клеток выбирают по наличию одного или более маркеров, закодированных экспрессируемыми в растении генами, которые переносятся вместе с целевым геном, после чего данный трансформированный материал регенерируется в целое растение. Чтобы выбрать трансформированные растения, растительный материал, полученный в ходе трансформации, как правило, подвергают таким селективным условиям, чтобы трансформированные растения можно было отличить от нетрансформированных. Например, семена, полученные описанным способом, могут быть засеяны, а после начального этапа роста подвергнуты подходящему способу селекции путем опрыскивания. Еще один возможный способ заключается в выращивании семян, при необходимости прошедших стерилизацию, в чаше с агаром с использованием подходящего селективного вещества, так, чтобы в

растениях произрастали только трансформированные семена. В качестве альтернативы, может быть произведен скрининг трансформированных растений на наличие вышеописанного селектируемого маркера.

После переноса ДНК и регенерации, предположительно трансформированные растения могут быть также исследованы с использованием Саузерн анализа на наличие целевого гена, номера копии и/или геномной организации. В качестве альтернативы или дополнения, уровни экспрессии вновь введенной ДНК могут исследоваться с использованием Нозерн-анализа и/или Вестерн-анализа, оба способа хорошо известны специалистам.

Генерированные трансформированные растения могут размножаться различными способами, например, клональным размножением или классическим способом разведения растений. Например, первое поколение (или T1) трансформированного растения может иметь способность к самооплодотворению, могут быть выбраны трансформированные клетки гомозиготного второго поколения (или T2), и растения T2 могут затем размножаться классическими способами разведения растений. Генерированные трансформированные организмы могут принимать различные формы. Например, это могут быть гибриды трансформированных и нетрансформированных клеток, клоновые трансформированные клетки (например, все трансформированные клетки содержат экспрессию кассет), графты трансформированных и нетрансформированных тканей (например, в растениях трансформированный корневой отпрыск пересаживают в нетрансформированный побег).

Предпочтительно, экспрессия нуклеиновой кислоты в растении приводит к повышению стойкости растения к гербициду по сравнению с растением дикого типа.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к растению с клеткой растения в соответствии с настоящим изобретением, в котором экспрессия нуклеиновой кислоты приводит к повышению стойкости растения к гербициду по сравнению с растением дикого типа.

Растения, описанные в настоящем документе, могут быть как трансгенными зерновыми культурами, так и нетрансгенными растениями.

В дополнение к общему определению, приведенному выше, термины «трансгенный», «трансген» или «рекомбинантный» означают в отношении, например, нуклеотидной последовательности, экспрессионную кассету, генный конструкт или вектор, включающий нуклеотидную последовательность, или организм, трансформированный с помощью нуклеотидной последовательности, экспрессионными кассетами или векторами по настоящему изобретению, все эти конструкции, полученные рекомбинантными методами, в которых

- (a) нуклеотидные последовательности, кодирующие белки, использованные в методах настоящего изобретения, или
- (b) генетическая контрольная последовательность(и), которая функционально связана с последовательностью нуклеиновой кислоты согласно данному изобретению, например, промотор, или
- (c) a) и b)

не расположены в их естественной генетической среде или были изменены рекомбинантными методами, причем модификация может иметь форму, например, замещения, добавления, делеции, инверсии или вставки одного или более нуклеотидных остатков с целью обеспечить возможность экспрессии мутированной TrtA по настоящему изобретению. Под естественной генетической средой подразумевают естественный геномный или хромосомный локус в исходном растении или нахождение в геномной библиотеке. В случае геномной библиотеки, естественная генетическая среда нуклеотидной последовательности предпочтительно сохраняется, по меньшей мере, частично. Среда примыкает к нуклеотидной последовательности, по меньшей мере, с одной стороны и имеет последовательность длиной, по меньшей мере, 50 п. о., предпочтительно, по меньшей мере, 500 п. о., особенно предпочтительно, по меньшей мере, 1000 п. о. и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 5000 п. о. Природная кассета экспрессии – например, природная комбинация природного промотора нуклеотидных последовательностей с соответствующей нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид, подходящий для способов настоящего изобретения, как определено выше – становится трансгенной кассетой экспрессии, когда кассету экспрессии изменяют с помощью не природных, синтетических («искусственных») методов, таких как, например, мутагенная обработка. Подходящие методы описаны, например, в US 5,565,350 или WO 00/15815.

Таким образом, при использовании понятия «трансгенное растение» для целей настоящего изобретения подразумевают, как указано выше, что нуклеиновые кислоты находятся не в естественном локусе генома указанного растения, поэтому нуклеиновые кислоты могут экспрессироваться гомологически или гетерологически. Тем не менее, как было отмечено, трансгенный означает также, что, так как нуклеиновые кислоты по изобретению или используемому методу находятся в природной позиции в геноме растения, последовательность была изменена по отношению к природной последовательности, и/или регуляторные последовательности природных последовательностей были изменены. Термин «трансгенный» предпочтительно означает экспрессию нуклеиновых кислот по изобретению в неестественном локусе генома, т.е. гомологическую или, предпочтительно, гетерологическую экспрессию нуклеиновых кислот. Предпочтительные трансгенные растения указаны в данном документе. Также, термин «трансгенный» относится к любому растению, клетке растения, каллусу, ткани растения или части растения, которые содержат, по меньшей мере, один рекомбинантный полинуклеотид, целиком или частично. Во многих случаях, весь рекомбинантный полинуклеотид или его часть прочно интегрированы в хромосому или стабильный внехромосомный элемент для того, чтобы передаваться следующим поколениям. Для целей настоящего изобретения понятие «рекомбинантный полинуклеотид» относится к полинуклеотиду, который был изменен, перегруппирован или изменен с помощью генной инженерии. Примеры включают любой клонированный полинуклеотид или полинуклеотиды, соединенные или присоединенные к гетерологическим последовательностям. Понятие «рекомбинантный» не относится к изменениям полинуклеотидов, которые были получены в результате естественных процессов, таких как спонтанные мутации, или в результате неспонтанного мутагенеза, а затем селекции.

«Аллели» или «аллельные варианты» являются альтернативными формами определенного гена, расположенными в одинаковой хромосомной позиции. Такие варианты включают однонуклеотидный полиморфизм (SNP) и инсерционно-делеционный полиморфизм (INDEL). Размер INDEL обычно менее 100 п. о. SNP и INDELs образуют самую большую группу вариантов последовательности в природных полиморфных цепочках большинства организмов.

Понятие «вид» относится к группе растений одной разновидности, определенной наличием общих характеристик или черт, которые специалисты считают достаточными для отделения одного сорта или вида растений от другого. Ни одним понятием не подразумевается, что все растения какого-либо сорта или разнообразия будут генетически идентичными по отношению к целому гену или молекулярному уровню или что любое растение будет гомозиготным во всех локусах. Считается, что сорт или вид имеет способность передавать потомству определенный признак, если при самооплодотворении указанного сорта или вида, все потомство содержит эту черту. Понятие «линия разведения» или «линия» относится к группе растений одного вида, определенной наличием общих характеристик или черт, которые специалисты считают достаточными для отделения одной линии разведения или линии от другой. Ни одним понятием не подразумевается, что все растения любой линии разведения или линии будут генетически идентичными по отношению к целому гену или молекулярному уровню или что любое растение будет гомозиготным во всех локусах. Считается, что линия разведения или линия имеет способность передавать потомству определенный признак, если при самооплодотворении указанной линии или линии разведения, все потомство содержит эту черту. В настоящем изобретении, черта появляется в результате мутации в гене *Tg1A* растения или семени.

Растения настоящего изобретения, стойкие к гербицидам, содержащие полинуклеотиды, кодирующие полипептиды с мутированной *Tg1A*, также используют в способах повышения стойкости растений к гербицидам путем стандартного разведения растений, включая половое размножение. Эти способы включают скрещивание первого растения, которое является стойким к гербицидам растением изобретения, со вторым растением, которое может быть или может не быть стойким, как и первое растение, к тому же гербициду или гербицидам или может быть стойким к другому гербициду или гербицидам в отличие от первого растения. Вторым растением может быть любое растение, способное производить жизнеспособное потомство (т.е. семена) после скрещивания с первым растением. Чаще всего, но не обязательно, первое и второе растения являются растениями одного вида. Эти способы при необходимости могут включать отбор растений-потомков, содержащих полипептиды с мутированной *Tg1A* первого растения и характеристики стойкости к гербицидам второго растения. Потомство растений,

полученное данным способом настоящего изобретения, обладает повышенной стойкостью к гербицидам по сравнению с первым или вторым растением или обоими растениями. Если первое и второе растения являются стойкими к разным гербицидам, потомство растений будет иметь комбинированные характеристики устойчивости к гербицидам, свойственные первому и второму растениям. Способы по изобретению могут включать одно или несколько поколений обратного скрещивания потомства растений первого скрещивания с растением той же линии или генотипа, как у первого или второго растения. В качестве альтернативы, потомство первого скрещивания или любого последующего скрещивания может быть скрещено с третьим растением, которое имеет другую линию или генотип по сравнению с первым или вторым растением.

Настоящее изобретение также предоставляет растения, органы растения, ткани растения, клетки растения, семена и нечеловеческие клетки хозяина, которые трансформированы, по меньшей мере, одной полинуклеотидной молекулой, кассетой экспрессии или трансформационным вектором изобретения. Такие трансформированные растения, органы растения, ткани растения, клетки растения, семена и нечеловеческие клетки хозяина повысили устойчивость или стойкость к, по меньшей мере, одному гербициду при уровнях гербицида, которые убивают или препятствуют росту нетрансформированного растения, ткани растения, клетки растения, семян или нечеловеческих клеток хозяина. Предпочтительно, трансформированные растения, ткани растения, клетки растения и семена изобретения – это *Arabidopsis thaliana* и сельскохозяйственные культуры.

В другом варианте осуществления изобретения изобретение относится к семени, полученному из трансгенного растения с клеткой растения по настоящему изобретению, в котором семя передает потомству признак повышения стойкости растения к гербициду по сравнению с семенем дикого типа.

В соответствии с другими аспектами изобретения растения с устойчивостью к гербицидам по настоящему изобретению могут быть использованы в качестве устойчивых к гербициду донорских линий для развития, например, с использованием традиционных методов разведения растений для получения других сортовых и/или гибридных культур, обладающих такой характеристикой или характеристиками. Все такие полученные сорта или гибриды культур, содержащие наследственную характеристику или характеристики устойчивости к

гербициду, называют в данном документе потомством или потомками линии (или линий), устойчивой к гербициду.

В других вариантах осуществления настоящим изобретением предоставляется способ получения устойчивого к гербицидам растения. Указанный способ включает: скрещивание первого растения, обладающего устойчивостью к гербицидам, со вторым растением для получения потомства растения, обладающего устойчивостью к гербицидам, при этом первое растение и потомство растения, по меньшей мере, в некоторых своих клетках содержат полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растения, при этом действие рекомбинантного полинуклеотида в клетках первого растения приводит к экспрессии полипептида мутированной TrtA, кодированного указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида мутированной TrtA придает указанному растению устойчивость к гербицидам.

Могут применяться традиционные методы разведения растений, при помощи которых в растения-потомки, получившиеся в результате использования таких методов, вводится свойство устойчивости к гербицидам. В одном из случаев осуществления настоящим изобретением предоставляется способ создания растения-потомка, устойчивого к гербицидам, метод, включающий: скрещивание исходного растения с растением, устойчивым к гербицидам, для введения свойств устойчивости к гербицидам растения, устойчивого к гербицидам, в зародышевую плазму растения-потомка, отличающийся тем, что растение-потомок обладает повышенной устойчивостью к гербицидам по сравнению с исходным растением. В других вариантах осуществления изобретения данный способ также включает этап введения характеристик устойчивости к гербицидам посредством использования традиционных методик разведения растений для получения растения-потомка, обладающего характеристиками устойчивости к гербицидам.

В других аспектах к растениям настоящего изобретения относятся растения, которые, помимо наличия у них устойчивости к гербицидам, были подвержены дальнейшим генетическим модификациям путем разведения, мутагенеза или генной инженерии, например, получили устойчивость к другим специфичным классам гербицидов, таким как ингибиторы AHAS, ауксиновые гербициды, отбеливающие гербициды, такие как ингибиторы гидроксифенилпируват-диоксигеназы (ГФПДГ) или фитоин десатуразы (PDS); ингибиторы EPSPS, такие

как глифосат; ингибиторы глутаминсинтетазы (GS), такие как глюфосинат; ингибиторы биосинтеза липидов, такие как ацетил-СоА-карбоксилаза (ACCase); или оксинил-гербициды (т.е. бромоксинил или иоксинил) в результате применения обычных способов разведения или генной инженерии. Таким образом, устойчивые к гербицидам растения по изобретению можно сделать устойчивыми к различным классам гербицидов с помощью многократных генетических модификаций, таких как устойчивость к глифосату и одновременно к глюфосинату, или к глифосату и одновременно к гербициду другого класса, как ингибиторы ГФПДГ, ингибиторы AHAS или ингибиторы ACCase. Данные технологии формирования устойчивости к гербицидам описаны, например, в *Pest Management Science* (том, год, страница): 61, 2005, 246; 61, 2005, 258; 61, 2005, 277; 61, 2005, 269; 61, 2005, 286; 64, 2008, 326; 64, 2008, 332; *Weed Science* 57, 2009, 108; *Australian Journal of Agricultural Research* 58, 2007, 708; *Science* 316, 2007, 1185; и в материалах, на которые в указанном документе имеются ссылки. Например, устойчивые к гербицидам растения по настоящему изобретению в некоторых вариантах осуществления изобретения могут быть устойчивыми к ингибиторам ACCase, таким как гербициды с окончанием на «-дим» (например, циклоксидим, сетоксидим, клетодим или тепралоксидим), гербициды с окончанием на «-фоп» (например, клодинафоп, диклофоп, флуазифоп, галоксифоп или хизалофоп) и гербициды с окончанием на «-ден» (например, пиноксаден); к ауксиновым гербицидам, таким как дикамба, к ингибиторам EPSPS, таким как глифосат; к другим ингибиторам биосинтеза целлюлозы, а также к ингибиторам GS, таким как глюфосинат.

В дополнение к данным классам ингибиторов, растения настоящего изобретения, устойчивые к гербицидам, могут также быть устойчивыми к гербицидам с другими способами действия, например, к хлорофиллам/каротеноидам, разрушителям клеточной оболочки, ингибиторам фотосинтеза, ингибиторам деления клетки, корневым ингибиторам, ингибиторам побегов и их комбинациям.

Подобные характеристики устойчивости могут выражаться, например, в виде мутантных белков HPPD или белков HPPD дикого типа в виде мутантных белков PPO или белков PPO дикого типа, мутантных белков AHASL, мутантных белков ACCase, мутантных белков EPSPS или белков мутантной глутаминсинтетазы; либо в качестве нативной, инбредной или трансгенной

арилоксиалканоат диоксигеназы (AAD или DHT), галоарилнитрилов (BXN), 2,2-дихлорпропионовой кислоты дегалогеназы (DEH), глифосат-N-ацетилтрансферазы (GAT), глифосат декарбоксилазы (GDC), глифосатоксидоредуктазы (GOX), глутатион-S-трансферазы (GST), фосфинотрицин ацетилтрансферазы (PAT или bar) или белков CYP450, имеющих активность расщепления гербицидов. Растения по настоящему изобретению, устойчивые к гербицидам, можно также сочетать с другими характеристиками, включая, в том числе, пестицидные черты, такие как Bt Cry и другие белки с пестицидной активностью к жесткокрылым насекомым, чешуйчатокрылым, нематодам и другим вредителям; питательные или нутрицевтические характеристики, такие как изменённое содержание масла и другие известные в данной области знаний.

Более того, другие варианты осуществления изобретения также охватывают устойчивые к гербицидам растения посредством использования технологий рекомбинантных ДНК и/или селекции и/или отбираются иным образом по данным характеристикам, которые способны синтезировать один или более инсектицидный белок, особенно белки из бактериального вида *Bacillus*, в частности, *Bacillus thuringiensis*, такие как [дельта]-эндотоксины, напр., CryIA(b), CryIA(c), CryIF, CryIF(a2), CryIIA(b), CryIIIA, CryIIIB(b1) или Cry9c; растительные инсектицидные белки (VIP), например, VIP1, VIP2, VIP3 или VIP3A; инсектицидные белки колонизирующих бактерий нематодов, напр. *Photorhabdus* spp. или *Xenorhabdus* spp.; токсины, вырабатываемые животными, такие как токсины скорпиона, токсины паукообразных, токсины ос, либо другие специфические нейротоксины насекомых; токсины, вырабатываемые грибами, такие как токсины стрептомицетов; растительные лектины, такие как лектины гороха или ячменя; агглютинин; ингибиторы протеиназы, такие как трипсин ингибиторы, серин-протеаза ингибиторы, пататин, цистатин или папаин ингибиторы; белки, инактивирующие рибосому (RIP), такие как ризин, кукуруза-RIP, абрин, луффин, сапорин или бриодин; ферменты метаболизма стероидов, такие как 3-гедрокси-стероид оксидаза, экидистероиды-IDP-гликозил-трансфераза, холестеролоксидаза, ингибиторы экидиозоны или HMG-CoA-редуктаза; ингибиторы ионных каналов, такие как ингибиторы каналов натрия или кальция; ювенильный гормон эстераза; диуретические рецепторы гормона (спирально кининовой рецепторы); стильбена синтазы, бибензил синтазы, хитиназа или

гликаназы. В контексте настоящего изобретения, под данными инсектицидными белками или токсинами должны пониматься также претоксины, гибридные белки, укороченные или модифицированные другим способом белки. Гибридные белки характеризуются новыми комбинациями белковых доменов (смотрите, например, WO 02/015701). Примеры подобных токсинов или генетически модифицированных растений, способных синтезировать такие токсины, описаны, например, в EP-A 374 753, WO 93/007278, WO 95/34656, EP-A 427 529, EP-A 451 878, WO 03/18810 и WO 03/52073. Способы производства подобных генетически модифицированных растений известны специалистам данной области и описаны, например, в вышеуказанных публикациях. Данные инсектицидные белки, которые содержатся в генетически модифицированных растениях, придают растениям, производящим данные белки, устойчивость к вредителям всех таксономических групп членистоногих, в частности, жукам (Coeloptera), двукрылым насекомым (Diptera), мотылькам (Lepidoptera) и круглым червям (Nematoda).

В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессия одного или более белковых токсинов (например, инсектицидных белков) в растения, устойчивые к гербицидам, является эффективным средством контроля организмов, включающих, например, представителей классов и порядков: жесткокрылые, такие как американская фасолевая зерновка *Acanthoscelides obtectus*; листоед *Agelastica alni*; жуки-щелкуны (*Agriotes lineatus*, *Agriotes obscurus*, *Agriotes bicolor*); масляная плоскотелка *Ahasverus advena*; хрущ июньский *Amphimallon solstitialis*; мебельный точильщик *Anobium punctatum*; *Anthonomus* spp. (долгоносики); крошка свекловичная *Atomaria linearis*; кожееды (*Anthrenus* spp., *Attagenus* spp.); зерновка четырёхпятнистая *Callosobruchus maculatus*; блестянка полужесткокрылая *Carpophilus hemipterus*; рапсовый семенной скрытохоботник *Ceutorhynchus assimilis*; скрытохоботник рапсовый стеблевой зимний *Ceutorhynchus picipitarsis*; проволочники *Conoderus vespertinus* и *Conoderus falli*; слоник банановый *Cosmopolites sordidus*; новозеландский травяной жук *Costelytra zealandica*; хрущ блестящий зеленый *Cotinis nitida*; скрытохоботник стеблевой подсолнечниковый *Cylindrocopturus adspersus*; ветчинный кожеед *Dermestes lardarius*; злаковые корневые черви *Diabrotica virgifera*, *Diabrotica virgifera virgifera* и *Diabrotica barberi*; мексиканская зерновка бобовая *Epilachna varivestis*; дровосек домовый *Hylotropes bajulus*; долгоносик листовой люцерновый *Hypera postica*; притворяшка блестящая

Gibbium psylloides; табачный жук *Lasioderma serricorne*; колорадский жук *Leptinotarsa decemlineata*; древогрызы *Lyctus* spp., рапсовый цветоед *Meligethes aeneus*; майский хрущ западный *Melolontha melolontha*; противоряшка американский *Mezium americanum*; притворяшка шелковистый *Niptus hololeucus*; точильщики хлебные *Oryzaephilus surinamensis* и *Oryzaephilus Mercator*; скосарь бороздчатый *Otiorhynchus sulcatus*; листоед хреновый *Phaedon cochleariae*, блошка крестоцветная *Phyllotreta cruciferae*; блошка полосатая *Phyllotreta striolata*; блошка рапсовая *Psylliodes chrysocephala*; *Ptinus* spp. (противоряшки); точильщик зерновой *Rhizopertha dominica*; долгоносик полосатый *Sitona lineatus*; долгоносики рисовые и амбарные *Sitophilus oryzae* и *Sitophilus*; красный долгоносик подсолнечника *Smicronyx fulvus*; точильщик хлебный *Stegobium paniceum*; хрущак мучной большой *Tenebrio molitor*, хрущаки малые мучные (*Tribolium confusum*) *Tribolium castaneum* и *Tribolium confusum*; трогодермы (*Trogoderma* spp.); совка подсолнечниковая восклицательная *Zygogramma exclamationis*; кожистокрылые (уховёртки), такие как уховёртка обыкновенная *Forficula auricularia* и уховёртка прибрежная *Labidura riparia*; тараканообразные, такие как таракан чёрный *Blatta orientalis*; многоножка тепличная *Oxidus gracilis*; муха свекловичная *Pegomyia betae*; мушка шведская *Oscinella frit*; плодовые мушки (*Dacus* spp., *Drosophila* spp.); белые муравьи (термиты), включая виды, представляющие семейства термитов-жнецов, древоядных термитов, Дарвиновы термиты, носатые термиты, крылатые термиты, *Termitidae*, *Termopsidae*; клоп травяной *Lygus lineolaris*; тля свекловичная *Aphis fabae*; тля бахчевая и хлопковая *Aphis gossypii*; тля яблоневая зелёная *Aphis pomi*; белокрылка цитрусовая (*Dialeurodes citri*) *Aleurocanthus spiniferus*; табачная белокрылка *Bemisia tabaci*; капустная тля *Brevicoryne brassicae*; медяница грушева *Cacopsylla pyricola*; тля смородинная *Cryptomyzus ribis*; филлоксера виноградная листовая *Daktulosphaira vitifoliae*; листоблошка цитрусовая *Diaphorina citri*; цикадка картофельная *Empoasca fabae*; цикадка бобовая *Empoasca Solana*; цикадка виноградная *Empoasca vitis*; пушистая тля *Eriosoma lanigerum*; щитовка устрицевидная *Eulecanium corni*; тля сливовая опылённая *Hyalopterus arundinis*; тёмная цикадка *Laodelphax striatellus*; тля картофельная листовая *Macrosiphum euphorbiae*; тля персиковая зелёная *Myzus persicae*; цикадка рисовая зелёная *Nephotettix cincticeps*; цикадка коричневая *Nilaparvata lugens*; тля хмелевая *Phorodon humuli*; тля черёмуховая обыкновенная *Rhopalosiphum padi*; тля большая злаковая *Sitobion avenae*; чешуекрылые, такие как *Adoxophyes orana* (листовёртка сетчатая);

Archips podana (листовертка всеядная); *Bucculatrix pyrivorella* (минер грушевый); *Bucculatrix thurberiella* (моль кривоусая хлопковая); *Bupalus piniarius* (пяденица сосновая); *Carpocapsa pomonella* (яблонная плодожорка); *Chilo suppressalis* (огнёвка азиатская стеблевая); *Choristoneura fumiferana* (еловая листовертка-почкоед); *Cochylis hospes* (шерстолапка подсолнечниковая); *Diatraea grandiosella* (огнёвка кукурузная юго-западная); *Euprocilia ambiguella* (гроздевая листовертка); *Helicoverpa armigera* (коробочный червь); *Helicoverpa zea* (коробочный червь); *Heliothis virescens* (листовертка-почкоед табачная), *Homoeosoma electellum* (огнёвка подсолнечниковая); *Homona magnanima* (листовертка чайная западная); *Lithocolletis blancardella* (плодовая нижнеминирующая моль-пестрянка); *Lymantria dispar* (шелкопряд непарный); *Malacosoma neustria* (коконопряд); *Mamestra brassicae* (совка капустная); *Mamestra configurata* (совка латуковая); *Operophtera brumata* (пяденица зимняя); *Ostrinia nubilalis* (мотылёк кукурузный), *Panolis flammea* (совка сосновая), *Phyllocnistis citrella* (минер листовой цитрусовый); *Pieris brassicae* (белянка капустная); *Rachiplusia ni* (совка соевая); *Spodoptera exigua* (совка малая); *Spodoptera littoralis* (гусеница хлопковая); *Sylepta derogata* (листовертка хлопковая); *Trichoplusia ni* (совка капустная); прямокрылые, такие как сверчок обыкновенный *Acheta domesticus*, саранча египетская (*Anacridium* spp.), саранча перелётная *Locusta migratoria*, кобылка двухполосая *Melanoplus bivittatus*, кобылка отличительная *Melanoplus differ entialis*, кобылка краснобедрая *Melanoplus femurrubrum*, кобылка перелетная *Melanoplus sanguinipes*, медведка десятипалая *Neocurtilla hexadactyla*, саранча *Nomadacris septemfasciata*, медведка короткокрылая *Scapteriscus abbreviatus*, медведка южная *Scapteriscus borellii*, медведка рыжевато-бурая *Scapteriscus vicinus*, и саранча пустынная *Schistocerca gregaria*; симфилы, такие как многоножка садовая *Scutigera immaculata*; бахромчатокрылые, такие как трипс табачный *Frankliniella fusca*, трипс обыкновенный *Frankliniella intonsa*, трипс западный цветочный *Frankliniella occidentalis*, трипс хлопковый *Frankliniella schultzei*, трипс декоративный *Hercinothrips femoralis*, трипс соевый *Neohydatothrips variabilis*, трипс цитрусовый *Pezothrips kellyanus*, трипс авокадо *Scirtothrips perseae*, трипс дыневый *Thrips palmi*, и трипс луковый *Thrips tabaci*; и аналогичные организмы, а также их комбинации, включающие один или более указанных организмов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессия одного или более белковых токсинов (например, инсектицидных белков) в растения, устойчивые к гербицидам, является эффективным средством контроля листогрызцов, то есть представителей подсемейства листогрызцов семейства листоедов, предпочтительно *Phyllotreta* spp., таких как *Phyllotreta cruciferae* и/или *Phyllotreta triolata*. В других вариантах осуществления экспрессия одного или более белковых токсинов (например, инсектицидных белков) в устойчивых к гербицидам растениях может использоваться для борьбы со скрытнохоботником семенным, *Mamestra configurata*, клопиками травяным или молью капустной.

Кроме того, в одном варианте осуществления в объем изобретения входят устойчивые к гербицидам растения, которым, например, с использованием методов рекомбинантной ДНК и/или путем селекции и/или иного отбора по таким признакам, придана способность синтезировать один или более белков для повышения устойчивости или стойкости этих растений к бактериальным, вирусным или грибковым патогенам. Способы получения подобных генетически модифицированных растений известны специалистам.

Более того, в еще одном варианте осуществления изобретения растения, устойчивые к гербицидам, также входят в область изобретения, например, с помощью технологий рекомбинантных ДНК и/или селекции и/или отбираются иным образом по данным характеристикам, которые способны синтезировать один или более белков для повышения продуктивности (то есть содержания масел), устойчивости к засухе, солености или к иным факторам окружающей среды, ограничивающим рост, или устойчивость к вредителям, а также к бактериальным, вирусным или грибковым патогенам данных растений.

Более того, в других вариантах осуществления изобретения растения, устойчивые к гербицидам также входят в область изобретения, например, с помощью технологий рекомбинантных ДНК и/или селекции и/или отбираются иным образом по данным характеристикам, которые изменяются, в результате чего они содержат измененное количество одного или более веществ или новых веществ, например, для улучшения питания людей и животных, например, масличные культуры, которые производят улучшающие здоровье омега-3 жирные кислоты с длинной цепью или ненасыщенные омега-9 жирные кислоты (например, Nexera® grape, Dow Agro Sciences, Канада).

Более того, в некоторых вариантах осуществления изобретения растения, устойчивые к гербицидам, также входят в область изобретения, например, с помощью технологий рекомбинантных ДНК и/или селекции и/или отбираются иным образом по данным характеристикам, которые изменяются, в результате чего они содержат увеличенные количества витаминов и/или минералов и/или имеют улучшенные профили нутрицевтических соединений.

В одном из случаев осуществления растения по настоящему изобретению устойчивые к гербицидам по сравнению с растениями дикого типа, содержат увеличенное количество и улучшенный профиль соединения, выбранного из группы, содержащей: глюкозинолаты (например, глюкорафанин (4-метилсульфинилбутил-глюкозинолат), сульфорафан, 3-индолилметил-глюкосинат(глюкобрассицин), 1-метокси-3-индолилметил-глюкосинат (неоглюкобрассицин)); фенольные смолы (например, флавоноиды (например, кверцетин, кемпферол), производные гидроксициннамоила (например, 1,2,2'-тризинапоилгентиобиоза, 1,2-диферулоилгентиобиоза, 1,2'-дисинапоил-2-ферулоилгентиобиоза, 3-О-каффеоил-хинная (неохлорогеновая кислота)); а также витамины и минералы (например, витамин С, витамин Е, каротин, фолиевая кислота, ниацин, рибофлавин, тиамин, кальций, железо, магний, калий, селен и цинк).

В еще одном варианте осуществления изобретения растения по настоящему изобретению, устойчивые к гербицидам по сравнению с растениями дикого типа, содержат увеличенное количество и улучшенный профиль соединения, выбранного из группы, содержащей: прогоитрин; изотиоцианаты; индолы (продукты гидролиза глюкозинолат); глутатион; каротеноиды, такие как бета-каротин, ликопен и ксантофилл каротиноиды, такие как лютеин и зеаксантин; фенольные смолы, содержащие флавоноиды, такие как флавонолы (например, кверцетин, рутин), флаваны/таннины (такие как процианидины, содержащие кумарин, проантоцианидины, катехины и антоцианины); флавоны; фитоэстрогены, такие как куместаны, лигнаны, ресвератрол, изофлавоны, например, генистеин, даидзеин и глицитеин; лактоны резорциловой кислоты; органические соединения серы; фитостеролы; терпеноиды, такие как карназол, розмариновая кислота, глицирризины и сапонины; хлорофилл, хлорофиллин, сахара, антоцианин и ваниль.

В других вариантах осуществления растения, обладающие устойчивостью к гербицидам, по изобретению, по сравнению с растениями дикого вида, содержат большие количества или улучшенный профиль соединения, выбранного из группы, в состав которой входят винкристин, винбластин, таксаны (например, таксол (паклитаксел), баккатин III, 10-деацетилбаккатин III, 10-деацетил таксол, ксилосил таксол, 7-эпитаксол, 7-эпибаккатин III, 10-деацетилцефаломанин, 7-эпицефаломанин, таксотер, цефаломанин, ксилосил цефаломанин, таксагифин, 8-бензилокси таксагифин, 9-ацетилокси таксусин, 9-гидрокси таксусин, тайванksam, таксан Ia, таксан Ib, таксан Ic, таксан Id, GMP паклитаксел, 9-дигидро 13-ацетилбаккатин III, 10-деацетил-7-эпитаксол, тетрагидроканнабинол (ТГК), каннабидиол (КБД), генистеин, диадзеин, кодеин, морфин, хинин, шиконин, аймалазин, серпентин и тому подобные.

В соответствии с другими аспектами предоставляется способ обработки растения по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления изобретения данный способ предусматривает нанесение на растения композиции, которая является приемлемой с точки зрения сельского хозяйства. В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения, приемлемая с точки зрения сельского хозяйства композиция содержит ауксиновый гербицид в качестве активного ингредиента.

В еще одном аспекте настоящим изобретением предоставляется способ подготовки семян для получения потомства. Способ включает посадку семян, из которых можно получить растение по настоящему изобретению. В одном из вариантов осуществления способ также включает выращивание растения-потомка из семени и сбор семян-потомков растения-потомка. В других вариантах осуществления способ также включает обработку растения-потомка гербицидной композицией.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к пригодным для заготовки частям трансгенного растения по настоящему изобретению. Предпочтительно, пригодные для заготовки части предпочтительно содержат нуклеиновую кислоту TriA или белок TriA по настоящему изобретению. Пожинаемыми частями могут являться семена, корни, листья и/или цветки, содержащие нуклеиновую кислоту TriA или белок TriA, или их части.

Предпочтительными частями сои являются соевые бобы, содержащие нуклеиновую кислоту TrtA или белок TrtA.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к продуктам, получаемым из трансгенного растения по настоящему изобретению, его частей или из пригодных для заготовки частей такого растения. Предпочтительным растительным продуктом является фураж, жмыховая мука, масло или дражированные в процессе обработки семена. Предпочтительно, мука и/или масло содержат нуклеиновые кислоты TrtA или белки TrtA.

В еще одном варианте осуществления изобретения изобретение относится к способу получения продукта, при этом указанный способ включает:

- a) выращивание растений по изобретению или растений, которые могут быть получены способами по изобретению, и
- b) производство указанного продукта из растений по изобретению или с использованием растений по изобретению, либо частей указанных растений, например, их семена.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения включает следующие этапы:

- a) выращивание растений по изобретению,
- b) удаление пригодных для заготовки частей растений, описание которых приведено выше, а также
- c) производство указанного продукта из растений с использованием пригодных для заготовки частей растений по изобретению.

Данные продукты могут производиться в месте выращивания растений, либо для производства данных продуктов указанные растения и/или их части могут быть перенесены с места выращивания. Обычно, растение выращивают, и требующиеся части, пригодные для заготовки, извлекают из растения (если это целесообразно, в ходе повторяющихся технологических циклов), после чего продукт производят из частей растения, пригодных для заготовки. При применении способов по изобретению этап выращивания растения может производиться только один раз, а этап производства продукта может происходить в ходе повторяющихся технологических циклов, например, может циклически повторяться этап удаления частей растения, пригодных для заготовки, по изобретению и, при необходимости,

этап дальнейшей обработки этих частей растений для получения продукта. Также возможно, что этап выращивания растений по изобретению повторяют, и растения или части растений, пригодные для заготовки, хранят до этапа производства продукта из накопленного запаса растений или частей растений. Также, этапы выращивания растений и производства продукта могут происходить одновременно, частично или полностью. Обычно растения выращивают в течение определенного времени до этапа производства продукта.

В одном варианте осуществления продукты, полученные указанными способами по изобретению, являются растительными продуктами, такими как, помимо прочего, продукты питания, продукты, используемые для кормления животных, пищевые добавки, кормовые добавки, волокна, продукты, используемые в производстве косметической и/или фармацевтической продукции. К пищевым продуктам относится все используемое для питания и/или для снабжения питательными веществами. В частности, вещества и продукты, используемые для питания животных, также относятся к пищевым продуктам.

В еще одном варианте осуществления изобретения способы по изобретению используют для получения сельскохозяйственных продуктов, таких как, помимо прочего, экстракты из растений, белки, аминокислоты, углеводы, жиры, масла, полимеры, витамины и другие, подобные продукты.

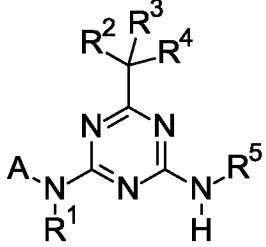
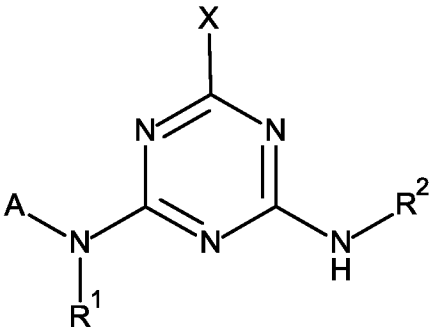
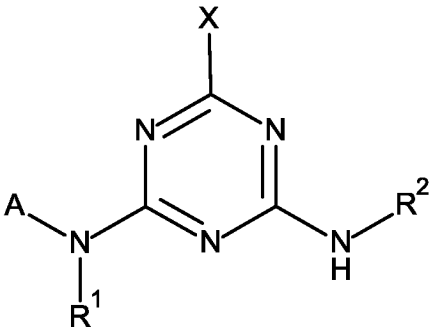
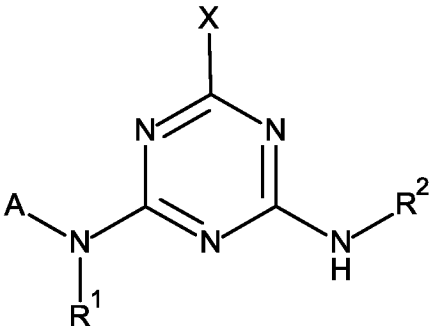
Возможно, что растительный продукт в значительной степени состоит из одного и более сельскохозяйственных продуктов.

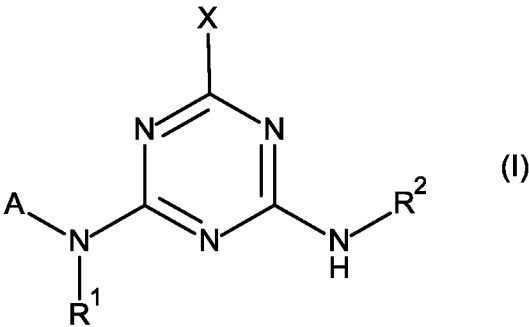
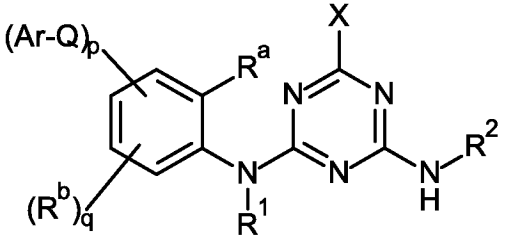
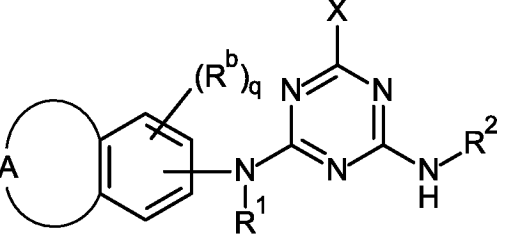
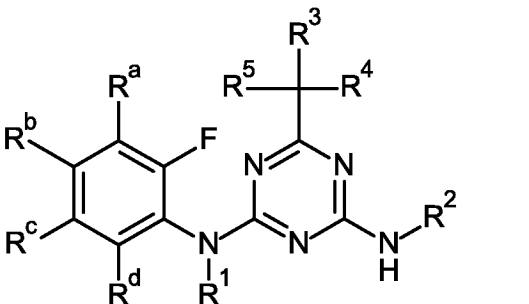
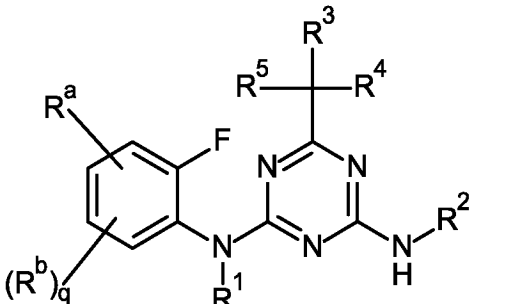
Гербициды

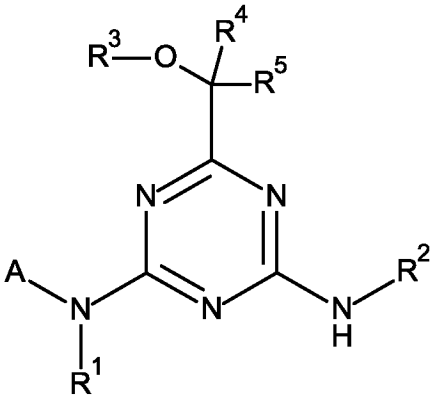
Как описано выше, настоящим изобретением предоставляются нуклеиновые кислоты, полипептиды, придающие растениям устойчивость к соединениям/ гербицидам, подавляющим или препятствующим биосинтезу клеточной стенки (целлюлозы).

Примерами гербицидов, которые могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением, т.е. гербицидов, устойчивостью/стойкостью к которым обладают растения по настоящему изобретению, являются соединения, известные специалистам, такие как азины. Примеры азинов, которые метаболизируются полипептидами мутированной TrtA по настоящему изобретению, подробно описаны в следующих патентных заявках, указанных в приведенной ниже Таблице 2.

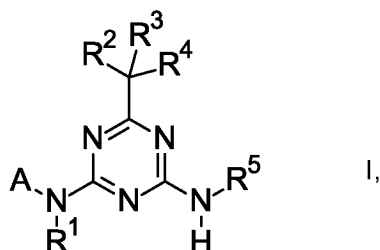
Таблица 2

Структурная Формула	Номер заявки/внутренняя ссылка; номер публикации
 (I),	PCT/EP2014/065092 PF75365; WO2015/007711 Страницы 2 – 7, строка 21
 (I)	EP 14162309.0 PF76068; WO2015/144881 Страница 3, строка 4 – страница 5, строка 3
 (I)	EP 14163356.0 PF76069; WO2015/150541
 (I)	EP 14163742.1 PF76635; WO2015/155129

 (I)	EP 14163743.9 PF76636; EP2930174
	EP 14165565.4 PF76857; WO2015/162166
	EP 14165624.9 PF76888; WO2015/162169
	EP 14164431.0 PF76890; WO2015/155271
	EP 14164434.4 PF76930; WO2015/155272

 (I)	EP 14164433.6 PF77027; WO2015/155273

Примеры предпочтительных гербицидов, которые могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением, включают азины, имеющие формулу (I).



причем

A означает фенил, который замещен двумя-пятью заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-галоалкила, C₂-C₆-алкенила, C₂-C₆-галоалкенила, C₂-C₆-алкинила, C₁-C₆-галоалкинила, OH, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинила, (C₁-C₆-алкил)сульфонил, амина, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонила, (C₁-C₆-алкокси)карбонила;

R¹ H, CN, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галоалкил, C₁-C₆-алкокси-C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-алкокси, (C₁-C₆-алкил)карбонил, (C₁-C₆-алкокси)карбонил, (C₁-C₆-алкил)сульфонил или фенилсульфонил,

причем фенил является незамещенным или замещен одним-пятью заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-галоалкила и C₁-C₆-алкокси;

R² H, галоген, CN, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галоалкил, C₂-C₆-алкенил, C₃-C₆-алкинил, C₃-C₆-циклоалкил, C₃-C₆-циклоалкенил, OH, C₁-C₆-алкокси

или C₁-C₆-алкокси-C₁-C₆-алкил;

R³ H, галоген, CN, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галоалкил или C₁-C₆-алкокси;

R⁴ H, галоген, CN, C₁-C₆-алкил или C₁-C₆-галоалкил; или

R³ и R⁴ вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют фрагмент, выбранный из группы, состоящей из карбонила, C₂-C₆-алкенила, C₃-C₆-циклоалкила, C₃-C₆-циклоалкенила и трех-шести-членного гетероциклила,

причем C₃-C₆-циклоалкил, C₃-C₆-циклоалкенил или трех-шести-членный гетероциклил является незамещенным или замещен одним-тремя заместителями, выбранными из галогена, CN, C₁-C₆-алкила и C₁-C₆-алкокси; и

R⁵ H, CN, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галоалкил, C₁-C₆-алкокси-C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-алкокси, (C₁-C₆-алкил)карбонил, (C₁-C₆-алкокси)карбонил, (C₁-C₆-алкил)сульфонил или фенилсульфонил,

причем фенил является незамещенным или замещен одним-пятью заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-галоалкила и C₁-C₆-алкокси;

включая их приемлемые с точки зрения сельского хозяйства соли или N-оксиды.

Предпочтительно, настоящим изобретением предоставляются азины формулы (I), причем

A означает 2-фтор-фенил, который замещен одним-четырьмя заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-галоалкила, OH, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинила, (C₁-C₆-алкил)сульфонила, amino, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонила и (C₁-C₆-алкокси)карбонила;

R¹ H, CN, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галоалкил, C₁-C₆-алкокси-C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-алкокси, (C₁-C₆-алкил)карбонил, (C₁-C₆-алкокси)карбонил, (C₁-C₆-алкил)сульфонил или фенилсульфонил,

причем фенил является незамещенным или замещен одним-пятью заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-галоалкила и C₁-C₆-

алкокси;

R² Н, галоген, CN, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галоалкил, C₂-C₆-алкенил, C₃-C₆-алкинил, C₃-C₆-циклоалкил, C₃-C₆-циклоалкенил, OH, C₁-C₆-алкокси или C₁-C₆-алкокси-C₁-C₆-алкил;

R³ Н, галоген, CN, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галоалкил или C₁-C₆-алкокси;

R⁴ Н, галоген, CN, C₁-C₆-алкил или C₁-C₆-галоалкил; или

R³ и R⁴ вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют фрагмент, выбранный из группы, состоящей из карбонила, C₂-C₆-алкенила, C₃-C₆-циклоалкила, C₃-C₆-циклоалкенила и трех-шести-членного гетероциклила,

причем C₃-C₆-циклоалкил, C₃-C₆-циклоалкенил или трех-шести-членный гетероциклил является незамещенным или замещен одним-тремя заместителями, выбранными из галогена, CN, C₁-C₆-алкила и C₁-C₆-алкокси; и

R⁵ Н, CN, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галоалкил, C₁-C₆-алкокси-C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-алкокси, (C₁-C₆-алкил)карбонил, (C₁-C₆-алкокси)карбонил, (C₁-C₆-алкил)сульфонил или фенилсульфонил,

причем фенил является незамещенным или замещен одним-пятью заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-галоалкила и C₁-C₆-алкокси;

включая их приемлемые с точки зрения сельского хозяйства соли или N-оксиды.

Также, в настоящем изобретении могут быть использованы агрохимические композиции, в состав которых входит, по меньшей мере, один азин формулы (I) и вспомогательное вещество, обычно использующееся для приготовления препаратов веществ для защиты посевов.

Настоящим изобретением также предоставляется применение азинов формулы (I) в качестве гербицидов, т.е. для борьбы с вредоносными растениями.

В случае если азины формулы (I) в соответствии с определением, приведенным в настоящем документе, способны образовывать геометрические изомеры, например, E/Z изомеры, в композициях по изобретению допустимо использование как чистых изомеров, так и их смесей.

В случае если азины формулы (I) в соответствии с описанием, приведенным в настоящем документе, имеют один или более хиральных центров и, как следствие, присутствуют в виде энантиомеров или диастереоизомеров, в композициях по изобретению допустимо использование как чистых энантиомеров и диастереоизомеров, так и их смесей.

Если азины формулы (I) согласно описанию в настоящем документе имеют в своем составе ионизируемые функциональные группы, то они также могут применяться в виде своих солей, которые приемлемы для сельскохозяйственных целей. В целом, могут быть использованы подходят соли тех катионов и кислотно-аддитивные соли тех кислот, чьи катионы и соответственно анионы не оказывают негативного влияния на активность активных соединений.

Предпочтительными катионами являются ионы щелочных металлов, предпочтительно лития, натрия и калия, щелочноземельных металлов, предпочтительно кальция и магния, а также переходных металлов, предпочтительно марганца, меди, цинка и железа, более предпочтительно аммоний и замещенный аммоний, в которых от одного до четырех атомов водорода замещены C₁-C₄-алкилом, гидроксиг-C₁-C₄-алкилом, C₁-C₄-алкокси-C₁-C₄-алкилом, гидроксиг-C₁-C₄-алкокси-C₁-C₄-алкилом, фенилом или бензилом, предпочтительно аммонием, метиламмонием, изопропиламмонием, диметиламмонием, диизопропиламмонием, триметиламмонием, гептиламмонием, додециламмонием, тетрадециламмонием, тетраметиламмонием, тетраэтиламмонием, тетрабутиламмонием, 2-гидроксиэтиламмонием (солью оламина), 2-(2-гидроксиэтил-1-окси)этил-1-иламмонием (солью дигликольамина), ди(2-гидроксиэтил-1-ил)аммонием (солью диоламина), трис(2-гидроксиэтил)аммонием (солью троламина), трис(2-гидроксипропил)аммонием, бензилтриметиламмонием, бензилтриэтиламмонием, N,N,N-триметилэтанолламмонием (солью холина), более предпочтительно ионы фосфония, ионы сульфония, предпочтительно три(C₁-C₄-алкил)сульфоний, такой как триметилсульфоний, и ионы сульфоксония, предпочтительно три(C₁-C₄-алкил)сульфоксоний, и наконец соли многоосновных аминов, таких как N,N-бис-(3-аминопропил)метиламин и диэтилентриамин.

Анионы пригодных кислотно-аддитивных солей включают, в основном, хлорид, бромид, фторид, йодид, водородсульфат, метилсульфат, сульфат, диводородфосфат, водородфосфат, нитрат, бикарбонат, карбонат,

гексафторсиликат, гексафторфосфат, бензоат, а также анионы C_1 - C_4 -алкановых кислот, предпочтительно формат, ацетат, пропионат и бутират.

Органические группы, указанные в определении переменных $R^1 - R^5$, являются (как, например, термин «галоген») собирательными понятиями для перечисления отдельных членов группы. Термин «галоген» означает в каждом случае фтор, хлор, бром или йод. Все углеводородные цепи, т.е. все алкильные, галоалкильные, алкенильные, алкинильные, алкокси-, алкилтио-, алкилсульфинильные, алкилсульфонильные, (алкил)амино-, ди(алкил)амино-цепи могут быть неразветвленными, либо разветвленными, причем приставка C_n - C_m в каждом случае означает возможное число атомов углерода в группе.

Примерами таких значений являются:

- C_1 - C_4 -алкил: например, CH_3 , C_2H_5 , н-пропил, $CH(CH_3)_2$, н-бутил, $CH(CH_3)-C_2H_5$, $CH_2-CH(CH_3)_2$ и $C(CH_3)_3$;
- C_1 - C_6 -алкил, а также C_1 - C_6 -алкильные фрагменты (C_1 - C_6 -алкил)карбонила, C_1 - C_6 -алкилокси- C_1 - C_6 -алкил: C_1 - C_4 -алкил, как указано выше, а также, например, н-пентил, 1-метилбутил, 2-метилбутил, 3-метилбутил, 2,2-диметилпропил, 1-этилпропил, н-гексил, 1,1-диметилпропил, 1,2-диметилпропил, 1-метилпентил, 2-метилпентил, 3-метилпентил, 4-метилпентил, 1,1-диметилбутил, 1,2-диметилбутил, 1,3-диметилбутил, 2,2-диметилбутил, 2,3-диметилбутил, 3,3-диметилбутил, 1-этилбутил, 2-этилбутил, 1,1,2-триметилпропил, 1,2,2-триметилпропил, 1-этил-1-метилпропил или 1-этил-2-метилпропил, предпочтительно метил, этил, н-пропил, 1-метилэтил, н-бутил, 1,1-диметилэтил, н-пентил или н-гексил;
- C_1 - C_4 -галоалкил: C_1 - C_4 -алкильный радикал, как указано выше, который частично или полностью замещен фтором, хлором, бромом и/или йодом, например, хлорметил, дихлорметил, трихлорметил, фторметил, дифторметил, трифторметил, хлорфторметил, дихлорфторметил, хлордифторметил, бромметил, йодметил, 2-фторэтил, 2-хлорэтил, 2-бромэтил, 2-йодэтил, 2,2-дифторэтил, 2,2,2-трифторэтил, 2-хлор-2-фторэтил, 2-хлор-2,2-дифторэтил, 2,2-дихлор-2-фторэтил, 2,2,2-трихлорэтил, пентафторэтил, 2-фторпропил, 3-фторпропил, 2,2-дифторпропил, 2,3-дифторпропил, 2-хлорпропил, 3-хлорпропил, 2,3-дихлорпропил, 2-бромпропил, 3-бромпропил, 3,3,3-трифторпропил, 3,3,3-трихлорпропил, 2,2,3,3,3-пентафторпропил, гептафторпропил, 1-(фторметил)-2-

фторэтил, 1-(хлорметил)-2-хлорэтил, 1-(бромметил)-2-бромэтил, 4-фторбутил, 4-хлорбутил, 4-бромбутил, нонафторбутил, 1,1,2,2-тетрафторэтил и 1-трифторметил-1,2,2,2-тетрафторэтил;

- C₁-C₆-галоалкил: C₁-C₄-галоалкил, как указано выше, а также, например, 5-фторпентил, 5-хлорпентил, 5-бромпентил, 5-йодпентил, ундекафторпентил, 6-фторгексил, 6-хлоргексил, 6-бромгексил, 6-йодгексил и додекафторгексил;

- C₃-C₆-циклоалкил: моноциклические насыщенные углеводороды с 3 - 6 членами кольца, такие как циклопропил, циклобутил, циклопентил и циклогексил;

- C₂-C₆-алкенил: например, этенил, 1-пропенил, 2-пропенил, 1-метилэтенил, 1-бутенил, 2-бутенил, 3-бутенил, 1-метил-1-пропенил, 2-метил-1-пропенил, 1-метил-2-пропенил, 2-метил-2-пропенил, 1-пентенил, 2-пентенил, 3-пентенил, 4-пентенил, 1-метил-1-бутенил, 2-метил-1-бутенил, 3-метил-1-бутенил, 1-метил-2-бутенил, 2-метил-2-бутенил, 3-метил-2-бутенил, 1-метил-3-бутенил, 2-метил-3-бутенил, 3-метил-3-бутенил, 1,1-диметил-2-пропенил, 1,2-диметил-1-пропенил, 1,2-диметил-2-пропенил, 1-этил-1-пропенил, 1-этил-2-пропенил, 1-гексенил, 2-гексенил, 3-гексенил, 4-гексенил, 5-гексенил, 1-метил-1-пентенил, 2-метил-1-пентенил, 3-метил-1-пентенил, 4-метил-1-пентенил, 1-метил-2-пентенил, 2-метил-2-пентенил, 3-метил-2-пентенил, 4-метил-2-пентенил, 1-метил-3-пентенил, 2-метил-3-пентенил, 3-метил-3-пентенил, 4-метил-3-пентенил, 1-метил-4-пентенил, 2-метил-4-пентенил, 3-метил-4-пентенил, 4-метил-4-пентенил, 1,1-диметил-2-бутенил, 1,1-диметил-3-бутенил, 1,2-диметил-1-бутенил, 1,2-диметил-2-бутенил, 1,2-диметил-3-бутенил, 1,3-диметил-1-бутенил, 1,3-диметил-2-бутенил, 1,3-диметил-3-бутенил, 2,2-диметил-3-бутенил, 2,3-диметил-1-бутенил, 2,3-диметил-2-бутенил, 2,3-диметил-3-бутенил, 3,3-диметил-1-бутенил, 3,3-диметил-2-бутенил, 1-этил-1-бутенил, 1-этил-2-бутенил, 1-этил-3-бутенил, 2-этил-1-бутенил, 2-этил-2-бутенил, 2-этил-3-бутенил, 1,1,2-триметил-2-пропенил, 1-этил-1-метил-2-пропенил, 1-этил-2-метил-1-пропенил и 1-этил-2-метил-2-пропенил;

- C₃-C₆-циклоалкенил: 1-циклопропенил, 2-циклопропенил, 1-циклобутенил, 2-циклобутенил, 1-циклопентенил, 2-циклопентенил, 1,3-циклопентадиенил, 1,4-циклопентадиенил, 2,4-циклопентадиенил, 1-циклогексенил, 2-циклогексенил, 3-циклогексенил, 1,3-циклогексадиенил, 1,4-циклогексадиенил, 2,5-циклогексадиенил;

- C₃-C₆-алкинил: например, 1-пропинил, 2-пропинил, 1-бутинил, 2-бутинил, 3-бутинил, 1-метил-2-пропинил, 1-пентинил, 2-пентинил, 3-пентинил, 4-пентинил, 1-метил-2-бутинил, 1-метил-3-бутинил, 2-метил-3-бутинил, 3-метил-1-бутинил, 1,1-диметил-2-пропинил, 1-этил-2-пропинил, 1-гексинил, 2-гексинил, 3-гексинил, 4-гексинил, 5-гексинил, 1-метил-2-пентинил, 1-метил-3-пентинил, 1-метил-4-пентинил, 2-метил-3-пентинил, 2-метил-4-пентинил, 3-метил-1-пентинил, 3-метил-4-пентинил, 4-метил-1-пентинил, 4-метил-2-пентинил, 1,1-диметил-2-бутинил, 1,1-диметил-3-бутинил, 1,2-диметил-3-бутинил, 2,2-диметил-3-бутинил, 3,3-диметил-1-бутинил, 1-этил-2-бутинил, 1-этил-3-бутинил, 2-этил-3-бутинил и 1-этил-1-метил-2-пропинил;

- C₁-C₄-алкокси: например, метокси, этокси, пропокси, 1-метилэтокси, бутокси, 1-метилпропокси, 2-метилпропокси и 1,1-диметилэтокси;

- C₁-C₆-алкокси, а также C₁-C₆-алкокси moieties of (C₁-C₆-алкокси)карбонил, C₁-C₆-алкокси-C₁-C₆-алкил: C₁-C₄-алкокси, как указано выше, а также, например, пентокси, 1-метилбутокси, 2-метилбутокси, 3-метоксилбутокси, 1,1-диметилпропокси, 1,2-диметилпропокси, 2,2-диметилпропокси, 1-этилпропокси, гекокси, 1-метилпентокси, 2-метилпентокси, 3-метилпентокси, 4-метилпентокси, 1,1-диметилбутокси, 1,2-диметилбутокси, 1,3-диметилбутокси, 2,2-диметилбутокси, 2,3-диметилбутокси, 3,3-диметилбутокси, 1-этилбутокси, 2-этилбутокси, 1,1,2-триметилпропокси, 1,2,2-триметилпропокси, 1-этил-1-метилпропокси и 1-этил-2-метилпропокси.

- C₁-C₄-алкилтио: например, метилтио, этилтио, пропилтио, 1-метилэтилтио, бутилтио, 1-метилпропилтио, 2-метилпропилтио и 1,1-диметилэтилтио;

- C₁-C₆-алкилтио: C₁-C₄-алкилтио, как указано выше, а также, например, пентилтио, 1-метилбутилтио, 2-метилбутилтио, 3-метилбутилтио, 2,2-диметилпропилтио, 1-этилпропилтио, гексилтио, 1,1-диметилпропилтио, 1,2-диметилпропилтио, 1-метилпентилтио, 2-метилпентилтио, 3-метилпентилтио, 4-метилпентилтио, 1,1-диметилбутилтио, 1,2-диметилбутилтио, 1,3-диметилбутилтио, 2,2-диметилбутилтио, 2,3-диметилбутилтио, 3,3-диметилбутилтио, 1-этилбутилтио, 2-этилбутилтио, 1,1,2-триметилпропилтио, 1,2,2-триметилпропилтио, 1-этил-1-метилпропилтио и 1-этил-2-метилпропилтио;

- C₁-C₆-алкилсульфинил (C₁-C₆-алкил-S(=O)-): например, метилсульфинил, этилсульфинил, пропилсульфинил, 1-метилэтилсульфинил,

бутилсульфинил, 1-метилпропилсульфинил, 2-метилпропилсульфинил, 1,1-диметилэтилсульфинил, пентилсульфинил, 1-метилбутилсульфинил, 2-метилбутилсульфинил, 3-метилбутилсульфинил, 2,2-диметилпропилсульфинил, 1-этилпропилсульфинил, 1,1-диметилпропилсульфинил, 1,2-диметилпропилсульфинил, гексилсульфинил, 1-метилпентилсульфинил, 2-метилпентилсульфинил, 3-метилпентилсульфинил, 4-метилпентил-сульфинил, 1,1-диметилбутилсульфинил, 1,2-диметилбутилсульфинил, 1,3-диметилбутил-сульфинил, 2,2-диметилбутил-сульфинил, 2,3-диметилбутилсульфинил, 3,3-диметилбутил-сульфинил, 1-этилбутилсульфинил, 2-этилбутилсульфинил, 1,1,2-триметилпропилсульфинил, 1,2,2-триметилпропилсульфинил, 1-этил-1-метилпропилсульфинил и 1-этил-2-метилпропилсульфинил;

- C₁-C₆-алкилсульфонил (C₁-C₆-алкил-S(O)₂-): например, метилсульфонил, этилсульфонил, пропилсульфонил, 1-метилэтилсульфонил, бутилсульфонил, 1-метилпропилсульфонил, 2-метил-пропилсульфонил, 1,1-диметилэтилсульфонил, пентилсульфонил, 1-метилбутилсульфонил, 2-метилбутилсульфонил, 3-метилбутилсульфонил, 1,1-диметилпропилсульфонил, 1,2-диметилпропилсульфонил, 2,2-диметилпропилсульфонил, 1-этилпропил-сульфонил, гексилсульфонил, 1-метилпентилсульфонил, 2-метилпентил-сульфонил, 3-метилпентилсульфонил, 4-метилпентилсульфонил, 1,1-диметил-бутилсульфонил, 1,2-диметилбутилсульфонил, 1,3-диметилбутилсульфонил, 2,2-диметилбутилсульфонил, 2,3-диметилбутилсульфонил, 3,3-диметилбутил-сульфонил, 1-этилбутилсульфонил, 2-этилбутилсульфонил, 1,1,2-триметил-пропилсульфонил, 1,2,2-триметилпропилсульфонил, 1-этил-1-метилпропил-сульфонил и 1-этил-2-метилпропилсульфонил;

- (C₁-C₄-алкил)амино: например, метиламино, этиламино, пропиламино, 1-метилэтиламино, бутиламино, 1-метилпропиламино, 2-метилпропиламино или 1,1-диметилэтиламино;

- (C₁-C₆-алкил)амино: (C₁-C₄-алкиламино), как указано выше, а также, например, пентиламино, 1-метилбутиламино, 2-метилбутиламино, 3-метилбутиламино, 2,2-диметилпропиламино, 1-этилпропиламино, гексиламино, 1,1-диметилпропиламино, 1,2-диметилпропиламино, 1-метилпентиламино, 2-метилпентиламино, 3-метилпентиламино, 4-метилпентиламино, 1,1-диметилбутиламино, 1,2-диметилбутиламино, 1,3-диметилбутиламино, 2,2-диметилбутиламино, 2,3-диметилбутил-амино 3,3-диметилбутиламино, 1-

этилбутиламино, 2-этилбутиламино, 1,1,2-триметилпропиламино, 1,2,2-триметилпропиламино, 1-этил-1-метилпропиламино или 1-этил-2-метилпропиламино;

- ди(C₁-C₄-алкил)амино: например, N,N-диметиламино, N,N-диэтиламино, N,N-ди(1-метилэтил)амино, N,N-дипропиламино, N,N-дибутиламино, N,N-ди(1-метилпропил)амино, N,N-ди(2-метилпропил)амино, N,N-ди(1,1-диметилэтил)амино, N-этил-N-метиламино, N-метил-N-пропиламино, N-метил-N-(1-метилэтил)амино, N-бутил-N-метиламино, N-метил-N-(1-метилпропил)амино, N-метил-N-(2-метилпропил)амино, N-(1,1-диметилэтил)-N-метиламино, N-этил-N-пропиламино, N-этил-N-(1-метилэтил)амино, N-бутил-N-этиламино, N-этил-N-(1-метилпропил)амино, N-этил-N-(2-метилпропил)амино, N-этил-N-(1,1-диметилэтил)амино, N-(1-метилэтил)-N-пропиламино, N-бутил-N-пропиламино, N-(1-метилпропил)-N-пропиламино, N-(2-метилпропил)-N-пропиламино, N-(1,1-диметилэтил)-N-пропиламино, N-бутил-N-(1-метилэтил)амино, N-(1-метилэтил)-N-(1-метилпропил)амино, N-(1-метилэтил)-N-(2-метилпропил)амино, N-(1,1-диметилэтил)-N-(1-метилэтил)амино, N-бутил-N-(1-метилпропил)амино, N-бутил-N-(2-метилпропил)амино, N-бутил-N-(1,1-диметилэтил)амино, N-(1-метилпропил)-N-(2-метилпропил)амино, N-(1,1-диметилэтил)-N-(1-метилпропил)-амино или N-(1,1-диметилэтил)-N-(2-метилпропил)амино;

- ди(C₁-C₆-алкил)амино: ди(C₁-C₄-алкил)амино, как указано выше, а также, например, N-метил-N-пентиламино, N-метил-N-(1-метилбутил)амино, N-метил-N-(2-метилбутил)амино, N-метил-N-(3-метилбутил)амино, N-метил-N-(2,2-диметилпропил)амино, N-метил-N-(1-этилпропил)амино, N-метил-N-гексиламино, N-метил-N-(1,1-диметилпропил)амино, N-метил-N-(1,2-диметилпропил)амино, N-метил-N-(1-метилпентил)амино, N-метил-N-(2-метилпентил)амино, N-метил-N-(3-метилпентил)амино, N-метил-N-(4-метилпентил)амино, N-метил-N-(1,1-диметилбутил)амино, N-метил-N-(1,2-диметилбутил)амино, N-метил-N-(1,3-диметилбутил)амино, N-метил-N-(2,2-диметилбутил)амино, N-метил-N-(2,3-диметилбутил)амино, N-метил-N-(3,3-диметилбутил)амино, N-метил-N-(1-этилбутил)амино, N-метил-N-(2-этилбутил)амино, N-метил-N-(1,1,2-триметилпропил)амино, N-метил-N-(1,2,2-триметилпропил)амино, N-метил-N-(1-этил-1-метилпропил)амино, N-метил-N-(1-этил-2-метилпропил)амино, N-этил-N-пентиламино, N-этил-N-(1-метилбутил)амино, N-этил-N-(2-метилбутил)амино, N-этил-N-(3-метилбутил)амино, N-этил-N-(2,2-диметилпропил)амино, N-этил-N-(1-этилпропил)амино, N-этил-N-гексиламино, N-этил-N-(1,1-диметилпропил)амино,

N-этил-N-(1,2-диметилпропил)амино, N-этил-N-(1-метилпентил)амино, N-этил-N-(2-метилпентил)амино, N-этил-N-(3-метилпентил)амино, N-этил-N-(4-метилпентил)амино, N-этил-N-(1,1-диметилбутил)амино, N-этил-N-(1,2-диметилбутил)амино, N-этил-N-(1,3-диметилбутил)амино, N-этил-N-(2,2-диметилбутил)амино, N-этил-N-(2,3-диметилбутил)амино, N-этил-N-(3,3-диметилбутил)амино, N-этил-N-(1-этилбутил)амино, N-этил-N-(2-этилбутил)амино, N-этил-N-(1,1,2-триметилпропил)амино, N-этил-N-(1,2,2-триметилпропил)амино, N-этил-N-(1-этил-1-метилпропил)амино, N-этил-N-(1-этил-2-метилпропил)амино, N-пропил-N-пентиламино, N-бутил-N-пентиламино, N,N-дипентиламино, N-пропил-N-гексиламино, N-бутил-N-гексиламино, N-пентил-N-гексиламино или N,N-дигексиламино;

- трех-шести-членный гетероцикл: моноциклический насыщенный или частично ненасыщенный углеводород с тремя-шестью членами кольца, как указано выше, который в дополнение к атомам углерода содержит один или два гетероатома, выбранных из O, S и N;

например, 2-оксиранил, 2-оксетанил, 3-оксетанил, 2-азиридирил, 3-тиетанил, 1-азетидинил, 2-азетидинил,

например, 2-тетрагидрофуранил, 3-тетрагидрофуранил, 2-тетрагидротиенил, 3-тетрагидротиенил, 2-пирролидинил, 3-пирролидинил, 3-изоксазолидинил, 4-изоксазолидинил, 5-изоксазолидинил, 3-изотиазолидинил, 4-изотиазолидинил, 5-изотиазолидинил, 3-пиразолидинил, 4-пиразолидинил, 5-пиразолидинил, 2-оксазолидинил, 4-оксазолидинил, 5-оксазолидинил, 2-тиазолидинил, 4-тиазолидинил, 5-тиазолидинил, 2-имидазолидинил, 4-имидазолидинил;

например, 2,3-дигидрофур-2-ил, 2,3-дигидрофур-3-ил, 2,4-дигидрофур-2-ил, 2,4-дигидрофур-3-ил, 2,3-дигидротиен-2-ил, 2,3-дигидротиен-3-ил, 2,4-дигидротиен-2-ил, 2,4-дигидротиен-3-ил, 4,5-дигидропиррол-2-ил, 4,5-дигидропиррол-3-ил, 2,5-дигидропиррол-2-ил, 2,5-дигидропиррол-3-ил, 4,5-дигидроизоксазол-3-ил, 2,5-дигидроизоксазол-3-ил, 2,3-дигидроизоксазол-3-ил, 4,5-дигидроизоксазол-4-ил, 2,5-дигидроизоксазол-4-ил, 2,3-дигидроизоксазол-4-ил, 4,5-дигидроизоксазол-5-ил, 2,5-дигидроизоксазол-5-ил, 2,3-дигидроизоксазол-5-ил, 4,5-дигидроизотиазол-3-ил, 2,5-дигидроизотиазол-3-ил, 2,3-дигидроизотиазол-3-ил, 4,5-дигидроизотиазол-4-ил, 2,5-дигидроизотиазол-4-ил,

2,3-дигидроизотиазол-4-ил, 4,5-дигидроизотиазол-5-ил, 2,5-дигидроизотиазол-5-ил, 2,3-дигидроизотиазол-5-ил, 2,3-дигидропиразол-2-ил, 2,3-дигидропиразол-3-ил, 2,3-дигидропиразол-4-ил, 2,3-дигидропиразол-5-ил, 3,4-дигидропиразол-3-ил, 3,4-дигидропиразол-4-ил, 3,4-дигидропиразол-5-ил, 4,5-дигидропиразол-3-ил, 4,5-дигидропиразол-4-ил, 4,5-дигидропиразол-5-ил, 2,3-дигидроимидазол-2-ил, 2,3-дигидроимидазол-3-ил, 2,3-дигидроимидазол-4-ил, 2,3-дигидроимидазол-5-ил, 4,5-дигидроимидазол-2-ил, 4,5-дигидроимидазол-4-ил, 4,5-дигидроимидазол-5-ил, 2,5-дигидроимидазол-2-ил, 2,5-дигидроимидазол-4-ил, 2,5-дигидроимидазол-5-ил, 2,3-дигидрооксазол-3-ил, 2,3-дигидрооксазол-4-ил, 2,3-дигидрооксазол-5-ил, 3,4-дигидрооксазол-3-ил, 3,4-дигидрооксазол-4-ил, 3,4-дигидрооксазол-5-ил, 2,3-дигидротиазол-3-ил, 2,3-дигидротиазол-4-ил, 2,3-дигидротиазол-5-ил, 3,4-дигидротиазол-3-ил, 3,4-дигидротиазол-4-ил, 3,4-дигидротиазол-5-ил, 3,4-дигидротиазол-2-ил, 3,4-дигидротиазол-3-ил, 3,4-дигидротиазол-4-ил;

например, 2-пиперидинил, 3-пиперидинил, 4-пиперидинил, 1,3-диоксан-2-ил, 1,3-диоксан-4-ил, 1,3-диоксан-5-ил, 1,4-диоксан-2-ил, 1,3-дитиан-2-ил, 1,3-дитиан-4-ил, 1,4-дитиан-2-ил, 1,3-дитиан-5-ил, 2-тетрагидропиранил, 3-тетрагидропиранил, 4-тетрагидропиранил, 2-тетрагидротиопиранил, 3-тетрагидротиопиранил, 4-тетрагидротиопиранил, 3-гексагидропиридазинил, 4-гексагидропиридазинил, 2-гексагидропиримидинил, 4-гексагидропиримидинил, 5-гексагидропиримидинил, 2-пиперазинил, тетрагидро-1,3-оксазин-2-ил, тетрагидро-1,3-оксазин-6-ил, 2-морфолинил, 3-морфолинил;

например, 2Н-пиран-2-ил, 2Н-пиран-3-ил, 2Н-пиран-4-ил, 2Н-пиран-5-ил, 2Н-пиран-6-ил, 3,6-дигидро-2Н-пиран-2-ил, 3,6-дигидро-2Н-пиран-3-ил, 3,6-дигидро-2Н-пиран-4-ил, 3,6-дигидро-2Н-пиран-5-ил, 3,6-дигидро-2Н-пиран-6-ил, 3,4-дигидро-2Н-пиран-3-ил, 3,4-дигидро-2Н-пиран-4-ил, 3,4-дигидро-2Н-пиран-6-ил, 2Н-тиопиран-2-ил, 2Н-тиопиран-3-ил, 2Н-тиопиран-4-ил, 2Н-тиопиран-5-ил, 2Н-тиопиран-6-ил, 5,6-дигидро-4Н-1,3-оксазин-2-ил;

Предпочтительные варианты осуществления изобретения, указанные ниже по тексту данного документа, необходимо понимать, как предпочтительные либо независимо друг от друга, либо в сочетании друг с другом.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения предпочтительными являются азины формулы (I), где переменные, либо независимо друг от друга, либо в комбинации друг с другом, имеют следующие значения:

Предпочтительными являются азины формулы (I), причем

А означает фенил, который замещен двумя-пятью заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-галоалкила, OH, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинила, (C₁-C₆-алкил)сульфонила, amino, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонила, (C₁-C₆-алкокси)карбонила;

особенно предпочтительно фенил, который замещен двумя-пятью заместителями,

выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, C₁-C₆-алкила и C₁-C₆-алкокси;

особенно предпочтительно выбранными из галогена и CN;

также особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl, CN и CH₃;

особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl и CN;

особенно предпочтительно фенил, который замещен двумя-четырьмя заместителями,

выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-галоалкила, OH, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинила, (C₁-C₆-алкил)сульфонила, amino, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонила, (C₁-C₆-алкокси)карбонила;

особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, C₁-C₆-алкила и C₁-C₆-алкокси;

особенно предпочтительно выбранными из галогена и CN;

также особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl, CN и CH₃;

более предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl и CN;

более предпочтительно фенил, который замещен двумя заместителями,

выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-

алкила, C₁-C₆-галоалкила, OH, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинила, (C₁-C₆-алкил)сульфонила, amino, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонила, (C₁-C₆-алкокси)карбонила;

особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, C₁-C₆-алкила и C₁-C₆-алкокси;

особенно предпочтительно выбранными из галогена и CN;

также особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl, CN и CH₃;

более предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl и CN;

еще более предпочтительно фенил, который замещен тремя заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-галоалкила, OH, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинила, (C₁-C₆-алкил)сульфонила, amino, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонила, (C₁-C₆-алкокси)карбонила;

особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, C₁-C₆-алкила и C₁-C₆-алкокси;

особенно предпочтительно выбранными из галогена и CN;

также особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl, CN и CH₃;

более предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl и CN;

еще более предпочтительно фенил, который замещен четырьмя заместителями,

выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-галоалкила, OH, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинила, (C₁-C₆-алкил)сульфонила, amino, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонила, (C₁-C₆-алкокси)карбонила;

особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из

галогена, CN, C₁-C₆-алкила и C₁-C₆-алкокси;

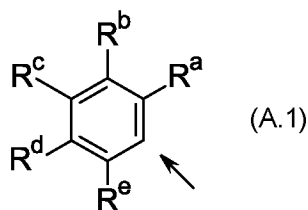
особенно предпочтительно выбранными из галогена и CN;

также особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl, CN и CH₃;

более предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl и CN.

Также предпочтительными являются азины формулы (I), причем

A означает



причем

R^a и R^e независимо друг от друга означают галоген, CN, NO₂, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галоалкил, OH, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинил, (C₁-C₆-алкил)сульфонил, амино, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонил, (C₁-C₆-алкокси)карбонил; и

R^b, R^c и R^d независимо друг от друга означают водород, галоген, CN, NO₂, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галоалкил, OH, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинил, (C₁-C₆-алкил)сульфонил, амино, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонил, (C₁-C₆-алкокси)карбонил;

особенно предпочтительно R^a и R^e независимо друг от друга означают галоген, CN, C₁-C₆-алкил или C₁-C₆-алкокси; и

R^b, R^c и R^d независимо друг от друга означают водород, галоген, CN, NO₂, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галоалкил или C₁-C₆-алкокси;

особенно предпочтительно R^a и R^e независимо друг от друга означают галоген или CN; и

R^b, R^c и R^d независимо друг от друга означают водород, галоген, CN, C₁-C₆-алкил или C₁-C₆-алкокси;

более предпочтительно R^a и R^e означают галоген; и

R^b , R^c и R^d независимо друг от друга означают водород, галоген или CN;

наиболее предпочтительно R^a и R^e означают галоген; и

R^b , R^c и R^d означают водород;

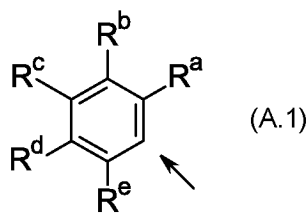
также наиболее предпочтительно R^a , R^b , R^d и R^e означают галоген; и

R^c водород;

также наиболее предпочтительно R^a , R^b , R^c , R^d и R^e означают галоген.

Также предпочтительными являются азины формулы (I), причем

A означает



причем R^a означает галоген или CN;

R^b и R^d означают H, галоген или CN;

R^c означает H или галоген;

R^e означает галоген, CN или C_1 - C_6 -алкил;

особенно предпочтительно R^a означает галоген;

R^b , R^c и R^d означают H или галоген; и

R^e означает галоген или CN;

особенно предпочтительно R^a , R^b , R^d и R^e означают галоген; и

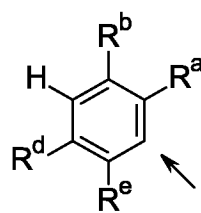
R^c означает H или галоген;

более предпочтительно R^a , R^b , R^d и R^e означают F; и

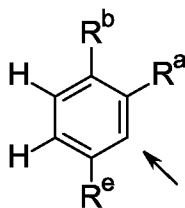
R^c означает H или F.

Особенно предпочтительными являются азины формулы (I), причем A выбран из группы, состоящей из (A.1.1), (A.1.2) и (A.1.3);

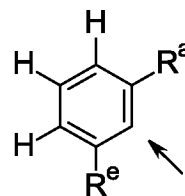
более предпочтительно выбранными из группы, состоящей из (A.1.2) и (A.1.3);



(A.1.1)



(A.1.2)



(A.1.3)

причем

R^a и R^e независимо друг от друга означают галоген, CN, NO₂, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галоалкил, OH, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинил, (C₁-C₆-алкил)сульфонил, amino, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонил, (C₁-C₆-алкокси)карбонил; и

R^b и R^d независимо друг от друга означают галоген, CN, NO₂, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галоалкил, OH, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинил, (C₁-C₆-алкил)сульфонил, amino, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонил, (C₁-C₆-алкокси)карбонил;

особенно предпочтительно R^a и R^e независимо друг от друга означают галоген, CN, C₁-C₆-алкил или C₁-C₆-алкокси; и

R^b и R^d независимо друг от друга означают галоген, CN, NO₂, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галоалкил или C₁-C₆-алкокси;

особенно предпочтительно R^a и R^e независимо друг от друга означают галоген или CN; и

R^b и R^d независимо друг от друга означают галоген, CN, C₁-C₆-алкил или C₁-C₆-алкокси;

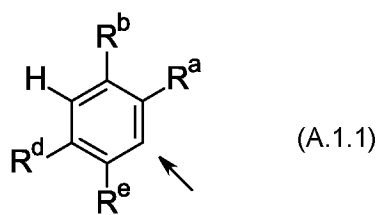
более предпочтительно R^a и R^e означают галоген; и

R^b и R^d независимо друг от друга означают галоген или CN;

наиболее предпочтительно R^a , R^b , R^d и R^e означают галоген.

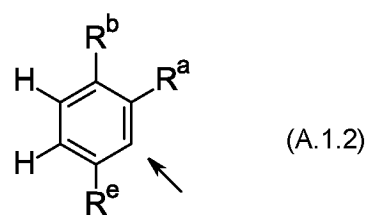
Также особенно предпочтительными являются азины формулы (I), причем

A означает



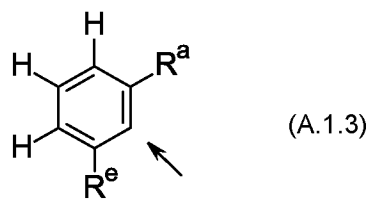
причем R^a , R^b , R^d и R^e имеют значения, в частности, предпочтительные значения, как определено выше.

Также особенно предпочтительными являются азины формулы (I), причем А означает



причем R^a , R^b и R^e имеют значения, в частности, предпочтительные значения, как определено выше.

Также особенно предпочтительными являются азины формулы (I), причем А означает



причем R^a и R^e имеют значения, в частности, предпочтительные значения, как определено выше.

Также предпочтительными являются азины формулы (I), причем

А означает 2-фтор-фенил, который замещен одним-четырьмя заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-галоалкила, OH, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинила, (C₁-C₆-алкил)сульфонила, amino, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонила и (C₁-C₆-алкокси)карбонила;

особенно предпочтительно 2-фтор-фенил, который замещен одним-четырьмя заместителями,

выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, C₁-C₆-алкила и C₁-C₆-алкокси;

особенно предпочтительно выбранными из галогена и CN;

также особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl, CN и CH₃;

особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl и CN;

особенно предпочтительно 2-фтор-фенил, который замещен одним-тремя заместителями,

выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-галоалкила, OH, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинила, (C₁-C₆-алкил)сульфонила, амина, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонила и (C₁-C₆-алкокси)карбонила;

особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, C₁-C₆-алкила и C₁-C₆-алкокси;

особенно предпочтительно выбранными из галогена и CN;

также особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl, CN и CH₃;

более предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl и CN;

более предпочтительно 2-фтор-фенил, который замещен одним заместителем,

выбранным из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-галоалкила, OH, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинила, (C₁-C₆-алкил)сульфонила, амина, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонила и (C₁-C₆-алкокси)карбонила;

особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, C₁-C₆-алкила и C₁-C₆-алкокси;

особенно предпочтительно выбранными из галогена и CN;

также особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl, CN и CH₃;

более предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl и CN;

также более предпочтительно 2-фтор-фенил, который замещен двумя заместителями,

выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-галоалкила, OH, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинила, (C₁-C₆-алкил)сульфонила, amino, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонила и (C₁-C₆-алкокси)карбонила;

особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, C₁-C₆-алкила и C₁-C₆-алкокси;

особенно предпочтительно выбранными из галогена и CN;

также особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl, CN и CH₃;

более предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl и CN;

также более предпочтительно 2-фтор-фенил, который замещен тремя заместителями,

выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-галоалкила, OH, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинила, (C₁-C₆-алкил)сульфонила, amino, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонила и (C₁-C₆-алкокси)карбонила;

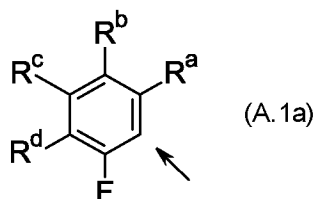
особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, C₁-C₆-алкила и C₁-C₆-алкокси;

особенно предпочтительно выбранными из галогена и CN;

также особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl, CN и CH₃;

более предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl и CN.

Также предпочтительными являются азины формулы (I), причем
А означает



причем

R^a означает галоген, CN, NO₂, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галоалкил, OH, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинил, (C₁-C₆-алкил)сульфонил, amino, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонил, (C₁-C₆-алкокси)карбонил; и

R^b , R^c и R^d независимо друг от друга означают водород, галоген, CN, NO₂, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галоалкил, OH, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинил, (C₁-C₆-алкил)сульфонил, amino, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонил, (C₁-C₆-алкокси)карбонил;

особенно предпочтительно R^a означает галоген, CN, C₁-C₆-алкил или C₁-C₆-алкокси; и

R^b , R^c и R^d независимо друг от друга означают водород, галоген, CN, NO₂, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галоалкил или C₁-C₆-алкокси;

особенно предпочтительно R^a означает галоген или CN; и

R^b , R^c и R^d независимо друг от друга означают водород, галоген, CN, C₁-C₆-алкил или C₁-C₆-алкокси;

более предпочтительно R^a означает галоген; и

R^b , R^c и R^d независимо друг от друга означают водород, галоген или CN;

наиболее предпочтительно R^a означает галоген; и

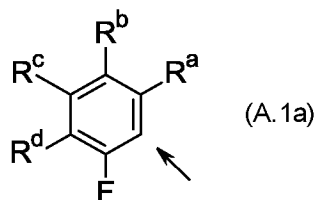
R^b , R^c и R^d означают водород;

также наиболее предпочтительно R^a , R^b и R^d означают галоген; и

R^c означает водород;

также наиболее предпочтительно R^a , R^b , R^c и R^d означают галоген.

Также предпочтительными являются азины формулы (I), причем А означает



причем R^a означает галоген, CN или C_1 - C_6 -алкил;

R^b и R^d означают H, галоген или CN; и

R^c означает H или галоген;

особенно предпочтительно R^a означает галоген или CN; и

R^b , R^c и R^d означают H или галоген;

особенно предпочтительно R^a , R^b и R^d означают галоген; и

R^c означает H или галоген;

Также особенно предпочтительно R^a , R^b и R^d означают галоген; и

R^c означает H, F, Br или I;

более предпочтительно R^a , R^b и R^d означают F; и

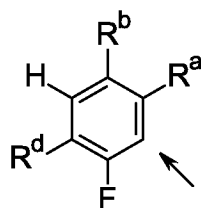
R^c означает F, Br или I;

также более предпочтительно R^a , R^b и R^d означают F; и

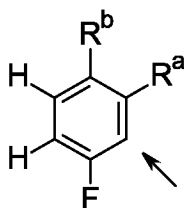
R^c означает H или F.

Особенно предпочтительными являются азины формулы (I), причем А выбран из группы, состоящей из (A.1a.1), (A.1a.2) и (A.1a.3);

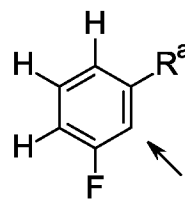
более предпочтительно выбранными из группы, состоящей из (A.1.2) и (A.1.3);



(A.1a.1)



(A.1a.2)



(A.1a.3)

причем

R^a означает галоген, CN, NO₂, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галоалкил, OH, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинил, (C₁-C₆-алкил)сульфонил, amino, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонил, (C₁-C₆-алкокси)карбонил; и

R^b и R^d независимо друг от друга означают галоген, CN, NO₂, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галоалкил, OH, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинил, (C₁-C₆-алкил)сульфонил, amino, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонил, (C₁-C₆-алкокси)карбонил;

особенно предпочтительно R^a означает галоген, CN, C₁-C₆-алкил или C₁-C₆-алкокси; и

R^b и R^d независимо друг от друга означают галоген, CN, NO₂, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галоалкил или C₁-C₆-алкокси;

особенно предпочтительно R^a означает галоген или CN; и

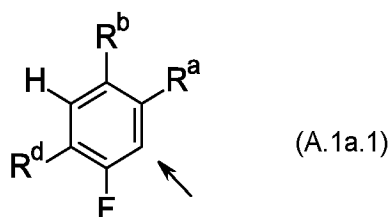
R^b и R^d независимо друг от друга означают галоген, CN, C₁-C₆-алкил или C₁-C₆-алкокси;

более предпочтительно R^a означает галоген; и

R^b и R^d независимо друг от друга означают галоген или CN;

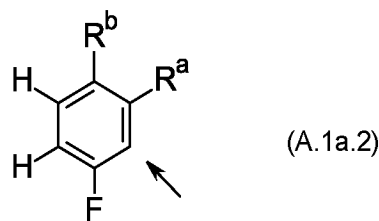
наиболее предпочтительно R^a , R^b и R^d означают галоген.

Также особенно предпочтительными являются азины формулы (I), причем А означает



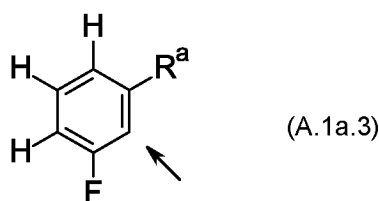
причем R^a , R^b и R^d имеют значения, в частности, предпочтительные значения, как определено выше.

Также особенно предпочтительными являются азины формулы (I), причем А означает



причем R^a и R^b имеют значения, в частности, предпочтительные значения, как определено выше.

Также особенно предпочтительными являются азины формулы (I), причем А означает



причем R^a имеет значения, в частности, предпочтительные значения, как определено выше.

Также предпочтительными являются азины формулы (I), причем

R^1 означает H, CN, C_1 - C_6 -алкил, C_1 - C_6 -галоалкил, C_1 - C_6 -алкокси- C_1 - C_6 -алкил, C_1 - C_6 -алкокси, (C_1 - C_6 -алкил)карбонил или (C_1 - C_6 -алкил)сульфонил;

особенно предпочтительно H, CN, C_1 - C_6 -алкил, C_1 - C_6 -алкокси- C_1 - C_6 -алкил, C_1 - C_6 -алкокси, (C_1 - C_6 -алкил)карбонил или (C_1 - C_6 -алкил)сульфонил;

особенно предпочтительно H, CN, CH_3 , CH_2OCH_3 , OCH_3 , $COCH_3$ или SO_2CH_3 ;

более предпочтительно водород.

Также предпочтительными являются азины формулы (I), причем

R^2 означает H, галоген, C_1 - C_6 -алкил или C_1 - C_6 -галоалкил;

особенно предпочтительно галоген, C_1 - C_6 -алкил или C_1 - C_6 -галоалкил;

также особенно предпочтительно H, F, Cl, CH_3 или CF_3 .

Также предпочтительными являются азины формулы (I), причем

R^3 и R^4 означают

независимо друг от друга Н, галоген, C₁-C₆-алкил или C₁-C₆-галоалкил; или вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют фрагмент, выбранный из группы, состоящей из C₃-C₆-циклоалкила, C₃-C₆-циклоалкенила и трех-шести-членного гетероциклила,

причем C₃-C₆-циклоалкил, C₃-C₆-циклоалкенил или трех-шести-членный гетероциклил является незамещенным или замещен одним-тремя заместителями, выбранными из галогена, CN, C₁-C₆-алкила и C₁-C₆-алкокси;

независимо друг от друга особенно предпочтительно Н, галоген, C₁-C₆-алкил или C₁-C₆-галоалкил; или

вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют фрагмент, выбранный из группы, состоящей из C₃-C₆-циклоалкила и C₃-C₆-циклоалкенила,

причем C₃-C₆-циклоалкил или C₃-C₆-циклоалкенил является незамещенным или замещен одним-тремя заместителями, выбранными из галогена, CN, C₁-C₆-алкила и C₁-C₆-алкокси;

независимо друг от друга особенно предпочтительно Н, галоген, C₁-C₆-алкил или C₁-C₆-галоалкил;

независимо друг от друга более предпочтительно Н, галоген или C₁-C₆-алкил.

Также предпочтительными являются азины формулы (I), причем

R² означает Н, галоген, C₁-C₆-алкил; и

R³ и R⁴ означают независимо друг от друга Н, галоген, C₁-C₆-алкил, или вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют C₃-C₆-циклоалкил;

особенно предпочтительно R² означает Н, галоген или C₁-C₆-алкил;

R³ означает C₁-C₆-алкил;

R⁴ означает Н, галоген или C₁-C₆-алкил;

R³ и R⁴ вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют C₃-C₆-циклоалкил;

особенно предпочтительно R² означает галоген или C₁-C₆-алкил;

R³ означает C₁-C₆-алкил;

R^4 означает H или C_1 - C_6 -алкил;

более предпочтительно R^2 означает галоген; и

R^3 и R^4 означают C_1 - C_6 -алкил.

Также предпочтительными являются азины формулы (I), причем

R^5 означает H, CN, C_1 - C_6 -алкил, C_1 - C_6 -галоалкил, C_1 - C_6 -алкокси- C_1 - C_6 -алкил, C_1 - C_6 -алкокси, (C_1 - C_6 -алкил)карбонил или (C_1 - C_6 -алкил)сульфонил;

особенно предпочтительно H, CN, C_1 - C_6 -алкил, C_1 - C_6 -алкокси- C_1 - C_6 -алкил, C_1 - C_6 -алкокси, (C_1 - C_6 -алкил)карбонил или (C_1 - C_6 -алкил)сульфонил; особенно предпочтительно H, CN, CH_3 , CH_2OCH_3 , OCH_3 , $COCH_3$ или SO_2CH_3 ;

более предпочтительно водород.

Также предпочтительными являются азины формулы (I), причем

A означает фенил, который замещен двумя-пятью заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, C_1 - C_6 -алкила и C_1 - C_6 -алкокси;

особенно предпочтительно выбранными из галогена и CN;

также особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl, CN и CH_3 ;

особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl и CN;

особенно предпочтительно фенил, который замещен двумя-четырьмя заместителями,

выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO_2 , C_1 - C_6 -алкила, C_1 - C_6 -галоалкила, OH, C_1 - C_6 -алкокси, C_1 - C_6 -алкилтио, (C_1 - C_6 -алкил)сульфинила, (C_1 - C_6 -алкил)сульфонила, амина, (C_1 - C_6 -алкил)амино, ди(C_1 - C_6 -алкил)амино, (C_1 - C_6 -алкил)карбонила, (C_1 - C_6 -алкокси)карбонила;

особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, C_1 - C_6 -алкила и C_1 - C_6 -алкокси;

особенно предпочтительно выбранными из галогена и CN;

также особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей

из F, Cl, CN и CH₃;

более предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl и CN;

особенно предпочтительно фенил, который замещен двумя заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-галоалкила, OH, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинила, (C₁-C₆-алкил)сульфонила, amino, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонила, (C₁-C₆-алкокси)карбонила;

особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, C₁-C₆-алкила и C₁-C₆-алкокси;

особенно предпочтительно выбранными из галогена и CN;

также особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl, CN и CH₃;

более предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl и CN;

также особенно предпочтительно фенил, который замещен тремя заместителями,

выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-галоалкила, OH, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинила, (C₁-C₆-алкил)сульфонила, amino, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонила, (C₁-C₆-алкокси)карбонила;

особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, C₁-C₆-алкила и C₁-C₆-алкокси;

особенно предпочтительно выбранными из галогена и CN;

также особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl, CN и CH₃;

более предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl и CN;

также особенно предпочтительно фенил, который замещен четырьмя заместителями,

выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-

алкила, C₁-C₆-галоалкила, ОН, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинила, (C₁-C₆-алкил)сульфонила, amino, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонила, (C₁-C₆-алкокси)карбонила;

особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, C₁-C₆-алкила и C₁-C₆-алкокси;

особенно предпочтительно выбранными из галогена и CN;

также особенно предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl, CN и CH₃;

более предпочтительно выбранными из группы, состоящей из F, Cl и CN;

R¹ означает H, CN, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галоалкил, C₁-C₆-алкокси-C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-алкокси, (C₁-C₆-алкил)карбонил или (C₁-C₆-алкил)сульфонил;

особенно предпочтительно H, CN, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-алкокси-C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-алкокси, (C₁-C₆-алкил)карбонил или (C₁-C₆-алкил)сульфонил;

особенно предпочтительно H, CN, CH₃, CH₂OCH₃, OCH₃, COCH₃ или SO₂CH₃;

более предпочтительно водород.

R² означает H, галоген, C₁-C₆-алкил или C₁-C₆-галоалкил;

особенно предпочтительно галоген, C₁-C₆-алкил или C₁-C₆-галоалкил;

также особенно предпочтительно H, F, CH₃ или CF₃;

R³ и R⁴ означают независимо друг от друга H, галоген, C₁-C₆-алкил или C₁-C₆-галоалкил; или

вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют фрагмент, выбранный из группы, состоящей из C₃-C₆-циклоалкила, C₃-C₆-циклоалкенила и трех-шести-членного гетероциклила,

причем C₃-C₆-циклоалкил, C₃-C₆-циклоалкенил или трех-шести-членный гетероциклил является незамещенным или замещен одним-тремя заместителями, выбранными из галогена, CN, C₁-C₆-алкила а и C₁-C₆-алкокси;

независимо друг от друга особенно предпочтительно Н, галоген, C₁-C₆-алкил или C₁-C₆-галоалкил; или

вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют фрагмент, выбранный из группы, состоящей из C₃-C₆-циклоалкила и C₃-C₆-циклоалкенила,

причем C₃-C₆-циклоалкил или C₃-C₆-циклоалкенил является незамещенным или замещен одним-тремя заместителями, выбранными из галогена, CN, C₁-C₆-алкила и C₁-C₆-алкокси;

независимо друг от друга особенно предпочтительно Н, галоген, C₁-C₆-алкил или C₁-C₆-галоалкил;

независимо друг от друга более предпочтительно Н, галоген или C₁-C₆-алкил;

и

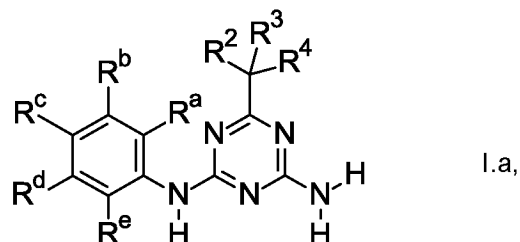
R⁵ означает Н, CN, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галоалкил, C₁-C₆-алкокси-C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-алкокси, (C₁-C₆-алкил)карбонил или (C₁-C₆-алкил)сульфонил;

особенно предпочтительно Н, CN, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-алкокси-C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-алкокси, (C₁-C₆-алкил)карбонил или (C₁-C₆-алкил)сульфонил;

особенно предпочтительно Н, CN, CH₃, CH₂OCH₃, OCH₃, COCH₃ или SO₂CH₃;

более предпочтительно водород.

Особенно предпочтительными являются азины формулы (I.a), которые соответствуют азинам формулы (I), где А – (А.1), а R¹ и R⁵ – это Н:



причем переменные R^a, R^b, R^c, R^d, R^e, R², R³ и R⁴ имеют значения, в частности, предпочтительные значения, как определено выше;

особенно предпочтительными являются азины формул (I.a.1) – (I.a.1406), приведенным в Таблице А, где определения переменных R^a , R^b , R^c , R^d , R^e , R^2 , R^3 и R^4 имеют особенное значение для соединений согласно данному изобретению не только в комбинации друг с другом, но также в каждом случае, по отдельности:

Таблица А

№	R^a	R^b	R^c	R^d	R^e	R^2	R^3	R^4
I.a.1	F	H	H	H	F	CH ₃	H	H
I.a.2	Cl	H	H	H	F	CH ₃	H	H
I.a.3	Br	H	H	H	F	CH ₃	H	H
I.a.4	CN	H	H	H	F	CH ₃	H	H
I.a.5	CH ₃	H	H	H	F	CH ₃	H	H
I.a.6	F	H	H	F	F	CH ₃	H	H
I.a.7	Cl	H	H	F	F	CH ₃	H	H
I.a.8	F	H	H	Cl	F	CH ₃	H	H
I.a.9	Cl	H	H	F	F	CH ₃	H	H
I.a.10	CN	H	H	F	F	CH ₃	H	H
I.a.11	F	H	H	CN	F	CH ₃	H	H
I.a.12	CN	H	H	F	F	CH ₃	H	H
I.a.13	F	H	F	H	F	CH ₃	H	H
I.a.14	Cl	H	F	H	F	CH ₃	H	H
I.a.15	CN	H	F	H	F	CH ₃	H	H
I.a.16	F	F	F	H	F	CH ₃	H	H
I.a.17	Cl	F	F	H	F	CH ₃	H	H
I.a.18	F	Cl	F	H	F	CH ₃	H	H
I.a.19	Cl	F	F	H	F	CH ₃	H	H
I.a.20	CN	F	F	H	F	CH ₃	H	H
I.a.21	F	CN	F	H	F	CH ₃	H	H
I.a.22	CN	F	F	H	F	CH ₃	H	H
I.a.23	F	F	H	F	F	CH ₃	H	H
I.a.24	Cl	F	H	F	F	CH ₃	H	H
I.a.25	F	Cl	H	F	F	CH ₃	H	H
I.a.26	CN	F	H	F	F	CH ₃	H	H

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.27	F	CN	H	F	F	CH ₃	H	H
I.a.28	F	F	F	F	F	CH ₃	H	H
I.a.29	Cl	F	F	F	F	CH ₃	H	H
I.a.30	F	Cl	F	F	F	CH ₃	H	H
I.a.31	CN	F	F	F	F	CH ₃	H	H
I.a.32	F	CN	F	F	F	CH ₃	H	H
I.a.33	H	F	F	F	F	CH ₃	H	H
I.a.34	F	F	Br	F	F	CH ₃	H	H
I.a.35	F	F	C≡CH	F	F	CH ₃	H	H
I.a.36	CF ₃	Cl	H	H	F	CH ₃	H	H
I.a.37	F	F	I	F	F	CH ₃	H	H
I.a.38	F	H	H	H	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.39	Cl	H	H	H	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.40	Br	H	H	H	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.41	CN	H	H	H	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.42	CH ₃	H	H	H	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.43	F	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.44	Cl	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.45	F	H	H	Cl	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.46	Cl	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.47	CN	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.48	F	H	H	CN	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.49	CN	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.50	F	H	F	H	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.51	Cl	H	F	H	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.52	CN	H	F	H	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.53	F	F	F	H	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.54	Cl	F	F	H	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.55	F	Cl	F	H	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.56	Cl	F	F	H	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.57	CN	F	F	H	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.58	F	CN	F	H	F	CH ₃	CH ₃	H

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.59	CN	F	F	H	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.60	F	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.61	Cl	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.62	F	Cl	H	F	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.63	CN	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.64	F	CN	H	F	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.65	F	F	F	F	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.66	Cl	F	F	F	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.67	F	Cl	F	F	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.68	CN	F	F	F	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.69	F	CN	F	F	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.70	H	F	F	F	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.71	F	F	Br	F	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.72	F	F	C≡CH	F	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.73	CF ₃	Cl	H	H	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.74	F	F	I	F	F	CH ₃	CH ₃	H
I.a.75	F	H	H	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.76	Cl	H	H	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.77	Br	H	H	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.78	CN	H	H	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.79	CH ₃	H	H	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.80	F	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.81	Cl	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.82	F	H	H	Cl	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.83	Cl	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.84	CN	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.85	F	H	H	CN	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.86	CN	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.87	F	H	F	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.88	Cl	H	F	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.89	CN	H	F	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.90	F	F	F	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.91	Cl	F	F	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.92	F	Cl	F	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.93	Cl	F	F	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.94	CN	F	F	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.95	F	CN	F	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.96	CN	F	F	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.97	F	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.98	Cl	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.99	F	Cl	H	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.100	CN	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.101	F	CN	H	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.102	F	F	F	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.103	Cl	F	F	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.104	F	Cl	F	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.105	CN	F	F	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.106	F	CN	F	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.107	H	F	F	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.108	F	F	Br	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.109	F	F	C≡CH	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.110	CF ₃	Cl	H	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.111	F	F	I	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.112	F	H	H	H	F	F	F	F
I.a.113	Cl	H	H	H	F	F	F	F
I.a.114	Br	H	H	H	F	F	F	F
I.a.115	CN	H	H	H	F	F	F	F
I.a.116	CH ₃	H	H	H	F	F	F	F
I.a.117	F	H	H	F	F	F	F	F
I.a.118	Cl	H	H	F	F	F	F	F
I.a.119	F	H	H	Cl	F	F	F	F
I.a.120	Cl	H	H	F	F	F	F	F
I.a.121	CN	H	H	F	F	F	F	F
I.a.122	F	H	H	CN	F	F	F	F

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.123	CN	H	H	F	F	F	F	F
I.a.124	F	H	F	H	F	F	F	F
I.a.125	Cl	H	F	H	F	F	F	F
I.a.126	CN	H	F	H	F	F	F	F
I.a.127	F	F	F	H	F	F	F	F
I.a.128	Cl	F	F	H	F	F	F	F
I.a.129	F	Cl	F	H	F	F	F	F
I.a.130	Cl	F	F	H	F	F	F	F
I.a.131	CN	F	F	H	F	F	F	F
I.a.132	F	CN	F	H	F	F	F	F
I.a.133	CN	F	F	H	F	F	F	F
I.a.134	F	F	H	F	F	F	F	F
I.a.135	Cl	F	H	F	F	F	F	F
I.a.136	F	Cl	H	F	F	F	F	F
I.a.137	CN	F	H	F	F	F	F	F
I.a.138	F	CN	H	F	F	F	F	F
I.a.139	F	F	F	F	F	F	F	F
I.a.140	Cl	F	F	F	F	F	F	F
I.a.141	F	Cl	F	F	F	F	F	F
I.a.142	CN	F	F	F	F	F	F	F
I.a.143	F	CN	F	F	F	F	F	F
I.a.144	H	F	F	F	F	F	F	F
I.a.145	F	F	Br	F	F	F	F	F
I.a.146	F	F	C≡CH	F	F	F	F	F
I.a.147	CF ₃	Cl	H	H	F	F	F	F
I.a.148	F	F	I	F	F	F	F	F
I.a.149	F	H	H	H	F	F	CF ₃	F
I.a.150	Cl	H	H	H	F	F	CF ₃	F
I.a.151	Br	H	H	H	F	F	CF ₃	F
I.a.152	CN	H	H	H	F	F	CF ₃	F
I.a.153	CH ₃	H	H	H	F	F	CF ₃	F
I.a.154	F	H	H	F	F	F	CF ₃	F

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.155	Cl	H	H	F	F	F	CF ₃	F
I.a.156	F	H	H	Cl	F	F	CF ₃	F
I.a.157	Cl	H	H	F	F	F	CF ₃	F
I.a.158	CN	H	H	F	F	F	CF ₃	F
I.a.159	F	H	H	CN	F	F	CF ₃	F
I.a.160	CN	H	H	F	F	F	CF ₃	F
I.a.161	F	H	F	H	F	F	CF ₃	F
I.a.162	Cl	H	F	H	F	F	CF ₃	F
I.a.163	CN	H	F	H	F	F	CF ₃	F
I.a.164	F	F	F	H	F	F	CF ₃	F
I.a.165	Cl	F	F	H	F	F	CF ₃	F
I.a.166	F	Cl	F	H	F	F	CF ₃	F
I.a.167	Cl	F	F	H	F	F	CF ₃	F
I.a.168	CN	F	F	H	F	F	CF ₃	F
I.a.169	F	CN	F	H	F	F	CF ₃	F
I.a.170	CN	F	F	H	F	F	CF ₃	F
I.a.171	F	F	H	F	F	F	CF ₃	F
I.a.172	Cl	F	H	F	F	F	CF ₃	F
I.a.173	F	Cl	H	F	F	F	CF ₃	F
I.a.174	CN	F	H	F	F	F	CF ₃	F
I.a.175	F	CN	H	F	F	F	CF ₃	F
I.a.176	F	F	F	F	F	F	CF ₃	F
I.a.177	Cl	F	F	F	F	F	CF ₃	F
I.a.178	F	Cl	F	F	F	F	CF ₃	F
I.a.179	CN	F	F	F	F	F	CF ₃	F
I.a.180	F	CN	F	F	F	F	CF ₃	F
I.a.181	H	F	F	F	F	F	CF ₃	F
I.a.182	F	F	Br	F	F	F	CF ₃	F
I.a.183	F	F	C≡CH	F	F	F	CF ₃	F
I.a.184	CF ₃	Cl	H	H	F	F	CF ₃	F
I.a.185	F	F	I	F	F	F	CF ₃	F
I.a.186	F	H	H	H	F	F	CH ₃	F

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.187	Cl	H	H	H	F	F	CH ₃	F
I.a.188	Br	H	H	H	F	F	CH ₃	F
I.a.189	CN	H	H	H	F	F	CH ₃	F
I.a.190	CH ₃	H	H	H	F	F	CH ₃	F
I.a.191	F	H	H	F	F	F	CH ₃	F
I.a.192	Cl	H	H	F	F	F	CH ₃	F
I.a.193	F	H	H	Cl	F	F	CH ₃	F
I.a.194	Cl	H	H	F	F	F	CH ₃	F
I.a.195	CN	H	H	F	F	F	CH ₃	F
I.a.196	F	H	H	CN	F	F	CH ₃	F
I.a.197	CN	H	H	F	F	F	CH ₃	F
I.a.198	F	H	F	H	F	F	CH ₃	F
I.a.199	Cl	H	F	H	F	F	CH ₃	F
I.a.200	CN	H	F	H	F	F	CH ₃	F
I.a.201	F	F	F	H	F	F	CH ₃	F
I.a.202	Cl	F	F	H	F	F	CH ₃	F
I.a.203	F	Cl	F	H	F	F	CH ₃	F
I.a.204	Cl	F	F	H	F	F	CH ₃	F
I.a.205	CN	F	F	H	F	F	CH ₃	F
I.a.206	F	CN	F	H	F	F	CH ₃	F
I.a.207	CN	F	F	H	F	F	CH ₃	F
I.a.208	F	F	H	F	F	F	CH ₃	F
I.a.209	Cl	F	H	F	F	F	CH ₃	F
I.a.210	F	Cl	H	F	F	F	CH ₃	F
I.a.211	CN	F	H	F	F	F	CH ₃	F
I.a.212	F	CN	H	F	F	F	CH ₃	F
I.a.213	F	F	F	F	F	F	CH ₃	F
I.a.214	Cl	F	F	F	F	F	CH ₃	F
I.a.215	F	Cl	F	F	F	F	CH ₃	F
I.a.216	CN	F	F	F	F	F	CH ₃	F
I.a.217	F	CN	F	F	F	F	CH ₃	F
I.a.218	H	F	F	F	F	F	CH ₃	F

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.219	F	F	Br	F	F	F	CH ₃	F
I.a.220	F	F	C≡CH	F	F	F	CH ₃	F
I.a.221	CF ₃	Cl	H	H	F	F	CH ₃	F
I.a.222	F	F	I	F	F	F	CH ₃	F
I.a.223	F	H	H	H	F	F	CH ₃	H
I.a.224	Cl	H	H	H	F	F	CH ₃	H
I.a.225	Br	H	H	H	F	F	CH ₃	H
I.a.226	CN	H	H	H	F	F	CH ₃	H
I.a.227	CH ₃	H	H	H	F	F	CH ₃	H
I.a.228	F	H	H	F	F	F	CH ₃	H
I.a.229	Cl	H	H	F	F	F	CH ₃	H
I.a.230	F	H	H	Cl	F	F	CH ₃	H
I.a.231	Cl	H	H	F	F	F	CH ₃	H
I.a.232	CN	H	H	F	F	F	CH ₃	H
I.a.233	F	H	H	CN	F	F	CH ₃	H
I.a.234	CN	H	H	F	F	F	CH ₃	H
I.a.235	F	H	F	H	F	F	CH ₃	H
I.a.236	Cl	H	F	H	F	F	CH ₃	H
I.a.237	CN	H	F	H	F	F	CH ₃	H
I.a.238	F	F	F	H	F	F	CH ₃	H
I.a.239	Cl	F	F	H	F	F	CH ₃	H
I.a.240	F	Cl	F	H	F	F	CH ₃	H
I.a.241	Cl	F	F	H	F	F	CH ₃	H
I.a.242	CN	F	F	H	F	F	CH ₃	H
I.a.243	F	CN	F	H	F	F	CH ₃	H
I.a.244	CN	F	F	H	F	F	CH ₃	H
I.a.245	F	F	H	F	F	F	CH ₃	H
I.a.246	Cl	F	H	F	F	F	CH ₃	H
I.a.247	F	Cl	H	F	F	F	CH ₃	H
I.a.248	CN	F	H	F	F	F	CH ₃	H
I.a.249	F	CN	H	F	F	F	CH ₃	H
I.a.250	F	F	F	F	F	F	CH ₃	H

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.251	Cl	F	F	F	F	F	CH ₃	H
I.a.252	F	Cl	F	F	F	F	CH ₃	H
I.a.253	CN	F	F	F	F	F	CH ₃	H
I.a.254	F	CN	F	F	F	F	CH ₃	H
I.a.255	H	F	F	F	F	F	CH ₃	H
I.a.256	F	F	Br	F	F	F	CH ₃	H
I.a.257	F	F	C≡CH	F	F	F	CH ₃	H
I.a.258	CF ₃	Cl	H	H	F	F	CH ₃	H
I.a.259	F	F	I	F	F	F	CH ₃	H
I.a.260	F	H	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.261	Cl	H	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.262	Br	H	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.263	CN	H	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.264	CH ₃	H	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.265	F	H	H	F	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.266	Cl	H	H	F	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.267	F	H	H	Cl	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.268	Cl	H	H	F	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.269	CN	H	H	F	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.270	F	H	H	CN	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.271	CN	H	H	F	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.272	F	H	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.273	Cl	H	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.274	CN	H	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.275	F	F	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.276	Cl	F	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.277	F	Cl	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.278	Cl	F	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.279	CN	F	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.280	F	CN	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.281	CN	F	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.282	F	F	H	F	F	F	CH ₃	CH ₃

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.283	Cl	F	H	F	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.284	F	Cl	H	F	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.285	CN	F	H	F	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.286	F	CN	H	F	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.287	F	F	F	F	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.288	Cl	F	F	F	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.289	F	Cl	F	F	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.290	CN	F	F	F	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.291	F	CN	F	F	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.292	H	F	F	F	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.293	F	F	Br	F	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.294	F	F	C≡CH	F	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.295	CF ₃	Cl	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.296	F	F	I	F	F	F	CH ₃	CH ₃
I.a.297	F	H	H	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.298	Cl	H	H	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.299	Br	H	H	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.300	CN	H	H	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.301	CH ₃	H	H	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.302	F	H	H	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.303	Cl	H	H	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.304	F	H	H	Cl	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.305	Cl	H	H	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.306	CN	H	H	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.307	F	H	H	CN	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.308	CN	H	H	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.309	F	H	F	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.310	Cl	H	F	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.311	CN	H	F	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.312	F	F	F	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.313	Cl	F	F	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.314	F	Cl	F	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.315	Cl	F	F	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.316	CN	F	F	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.317	F	CN	F	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.318	CN	F	F	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.319	F	F	H	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.320	Cl	F	H	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.321	F	Cl	H	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.322	CN	F	H	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.323	F	CN	H	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.324	F	F	F	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.325	Cl	F	F	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.326	F	Cl	F	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.327	CN	F	F	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.328	F	CN	F	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.329	H	F	F	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.330	F	F	Br	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.331	F	F	C≡CH	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.332	CF ₃	Cl	H	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.333	F	F	I	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
I.a.334	F	H	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.335	Cl	H	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.336	Br	H	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.337	CN	H	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.338	CH ₃	H	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.339	F	H	H	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.340	Cl	H	H	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.341	F	H	H	Cl	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.342	Cl	H	H	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.343	CN	H	H	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.344	F	H	H	CN	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.345	CN	H	H	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.346	F	H	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.347	Cl	H	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.348	CN	H	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.349	F	F	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.350	Cl	F	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.351	F	Cl	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.352	Cl	F	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.353	CN	F	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.354	F	CN	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.355	CN	F	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.356	F	F	H	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.357	Cl	F	H	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.358	F	Cl	H	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.359	CN	F	H	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.360	F	CN	H	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.361	F	F	F	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.362	Cl	F	F	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.363	F	Cl	F	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.364	CN	F	F	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.365	F	CN	F	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.366	H	F	F	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.367	F	F	Br	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.368	F	F	C≡CH	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.369	CF ₃	Cl	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.370	F	F	I	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.371	F	H	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.372	Cl	H	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.373	Br	H	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.374	CN	H	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.375	CH ₃	H	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.376	F	H	H	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.377	Cl	H	H	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.378	F	H	H	Cl	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.379	Cl	H	H	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.380	CN	H	H	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.381	F	H	H	CN	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.382	CN	H	H	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.383	F	H	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.384	Cl	H	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.385	CN	H	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.386	F	F	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.387	Cl	F	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.388	F	Cl	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.389	Cl	F	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.390	CN	F	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.391	F	CN	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.392	CN	F	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.393	F	F	H	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.394	Cl	F	H	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.395	F	Cl	H	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.396	CN	F	H	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.397	F	CN	H	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.398	F	F	F	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.399	Cl	F	F	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.400	F	Cl	F	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.401	CN	F	F	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.402	F	CN	F	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.403	H	F	F	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.404	F	F	Br	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.405	F	F	C≡CH	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.406	CF ₃	Cl	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.407	F	F	I	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
I.a.408	F	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.409	Cl	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.410	Br	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.411	CN	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.412	CH ₃	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.413	F	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.414	Cl	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.415	F	H	H	Cl	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.416	Cl	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.417	CN	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.418	F	H	H	CN	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.419	CN	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.420	F	H	F	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.421	Cl	H	F	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.422	CN	H	F	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.423	F	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.424	Cl	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.425	F	Cl	F	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.426	Cl	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.427	CN	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.428	F	CN	F	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.429	CN	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.430	F	F	H	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.431	Cl	F	H	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.432	F	Cl	H	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.433	CN	F	H	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.434	F	CN	H	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.435	F	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.436	Cl	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.437	F	Cl	F	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.438	CN	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.439	F	CN	F	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.440	H	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.441	F	F	Br	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.442	F	F	C≡CH	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -	

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.443	CF ₃	Cl	H	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.444	F	F	I	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.445	F	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.446	Cl	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.447	Br	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.448	CN	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.449	CH ₃	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.450	F	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.451	Cl	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.452	F	H	H	Cl	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.453	Cl	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.454	CN	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.455	F	H	H	CN	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.456	CN	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.457	F	H	F	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.458	Cl	H	F	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.459	CN	H	F	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.460	F	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.461	Cl	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.462	F	Cl	F	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.463	Cl	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.464	CN	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.465	F	CN	F	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.466	CN	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.467	F	F	H	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.468	Cl	F	H	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.469	F	Cl	H	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.470	CN	F	H	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.471	F	CN	H	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.472	F	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.473	Cl	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.474	F	Cl	F	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -	

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.475	CN	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.476	F	CN	F	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.477	H	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.478	F	F	Br	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.479	F	F	C≡CH	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.480	CF ₃	Cl	H	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.481	F	F	I	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.482	F	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.483	Cl	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.484	Br	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.485	CN	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.486	CH ₃	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.487	F	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.488	Cl	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.489	F	H	H	Cl	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.490	Cl	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.491	CN	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.492	F	H	H	CN	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.493	CN	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.494	F	H	F	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.495	Cl	H	F	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.496	CN	H	F	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.497	F	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.498	Cl	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.499	F	Cl	F	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.500	Cl	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.501	CN	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.502	F	CN	F	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.503	CN	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.504	F	F	H	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.505	Cl	F	H	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.506	F	Cl	H	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -	

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.507	CN	F	H	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.508	F	CN	H	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.509	F	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.510	Cl	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.511	F	Cl	F	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.512	CN	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.513	F	CN	F	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.514	H	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.515	F	F	Br	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.516	F	F	C≡CH	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.517	CF ₃	Cl	H	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.518	F	F	I	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.519	F	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.520	Cl	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.521	Br	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.522	CN	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.523	CH ₃	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.524	F	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.525	Cl	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.526	F	H	H	Cl	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.527	Cl	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.528	CN	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.529	F	H	H	CN	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.530	CN	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.531	F	H	F	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.532	Cl	H	F	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.533	CN	H	F	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.534	F	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.535	Cl	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.536	F	Cl	F	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.537	Cl	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.538	CN	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -	

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.539	F	CN	F	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.540	CN	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.541	F	F	H	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.542	Cl	F	H	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.543	F	Cl	H	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.544	CN	F	H	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.545	F	CN	H	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.546	F	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.547	Cl	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.548	F	Cl	F	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.549	CN	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.550	F	CN	F	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.551	H	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.552	F	F	Br	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.553	F	F	C≡CH	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.554	CF ₃	Cl	H	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.555	F	F	I	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.556	F	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.557	Cl	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.558	Br	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.559	CN	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.560	CH ₃	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.561	F	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.562	Cl	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.563	F	H	H	Cl	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.564	Cl	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.565	CN	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.566	F	H	H	CN	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.567	CN	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.568	F	H	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.569	Cl	H	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.570	CN	H	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.571	F	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.572	Cl	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.573	F	Cl	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.574	Cl	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.575	CN	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.576	F	CN	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.577	CN	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.578	F	F	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.579	Cl	F	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.580	F	Cl	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.581	CN	F	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.582	F	CN	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.583	F	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.584	Cl	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.585	F	Cl	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.586	CN	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.587	F	CN	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.588	H	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.589	F	F	Br	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.590	F	F	C≡CH	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.591	CF ₃	Cl	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.592	F	F	I	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.593	F	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.594	Cl	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.595	Br	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.596	CN	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.597	CH ₃	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.598	F	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.599	Cl	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.600	F	H	H	Cl	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.601	Cl	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.602	CN	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.603	F	H	H	CN	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.604	CN	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.605	F	H	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.606	Cl	H	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.607	CN	H	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.608	F	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.609	Cl	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.610	F	Cl	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.611	Cl	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.612	CN	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.613	F	CN	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.614	CN	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.615	F	F	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.616	Cl	F	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.617	F	Cl	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.618	CN	F	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.619	F	CN	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.620	F	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.621	Cl	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.622	F	Cl	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.623	CN	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.624	F	CN	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.625	H	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.626	F	F	Br	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.627	F	F	C≡CH	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.628	CF ₃	Cl	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.629	F	F	I	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.630	F	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.631	Cl	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.632	Br	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.633	CN	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.634	CH ₃	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.635	F	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.636	Cl	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.637	F	H	H	Cl	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.638	Cl	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.639	CN	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.640	F	H	H	CN	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.641	CN	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.642	F	H	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.643	Cl	H	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.644	CN	H	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.645	F	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.646	Cl	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.647	F	Cl	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.648	Cl	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.649	CN	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.650	F	CN	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.651	CN	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.652	F	F	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.653	Cl	F	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.654	F	Cl	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.655	CN	F	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.656	F	CN	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.657	F	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.658	Cl	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.659	F	Cl	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.660	CN	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.661	F	CN	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.662	H	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.663	F	F	Br	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.664	F	F	C≡CH	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.665	CF ₃	Cl	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.666	F	F	I	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.667	F	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.668	Cl	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.669	Br	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.670	CN	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.671	CH ₃	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.672	F	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.673	Cl	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.674	F	H	H	Cl	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.675	Cl	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.676	CN	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.677	F	H	H	CN	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.678	CN	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.679	F	H	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.680	Cl	H	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.681	CN	H	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.682	F	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.683	Cl	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.684	F	Cl	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.685	Cl	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.686	CN	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.687	F	CN	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.688	CN	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.689	F	F	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.690	Cl	F	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.691	F	Cl	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.692	CN	F	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.693	F	CN	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.694	F	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.695	Cl	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.696	F	Cl	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.697	CN	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.698	F	CN	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.699	H	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.700	F	F	Br	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.701	F	F	C≡CH	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.702	CF ₃	Cl	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.703	F	F	I	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.704	F	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.705	Cl	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.706	Br	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.707	CN	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.708	CH ₃	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.709	F	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.710	Cl	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.711	F	H	H	Cl	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.712	Cl	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.713	CN	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.714	F	H	H	CN	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.715	CN	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.716	F	H	F	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.717	Cl	H	F	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.718	CN	H	F	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.719	F	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.720	Cl	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.721	F	Cl	F	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.722	Cl	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.723	CN	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.724	F	CN	F	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.725	CN	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.726	F	F	H	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.727	Cl	F	H	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.728	F	Cl	H	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.729	CN	F	H	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.730	F	CN	H	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -	

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.731	F	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.732	Cl	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.733	F	Cl	F	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.734	CN	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.735	F	CN	F	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.736	H	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.737	F	F	Br	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.738	F	F	C≡CH	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.739	CF ₃	Cl	H	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.740	F	F	I	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.741	F	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.742	Cl	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.743	Br	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.744	CN	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.745	CH ₃	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.746	F	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.747	Cl	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.748	F	H	H	Cl	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.749	Cl	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.750	CN	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.751	F	H	H	CN	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.752	CN	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.753	F	H	F	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.754	Cl	H	F	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.755	CN	H	F	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.756	F	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.757	Cl	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.758	F	Cl	F	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.759	Cl	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.760	CN	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.761	F	CN	F	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.762	CN	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -	

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.763	F	F	H	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.764	Cl	F	H	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.765	F	Cl	H	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.766	CN	F	H	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.767	F	CN	H	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.768	F	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.769	Cl	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.770	F	Cl	F	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.771	CN	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.772	F	CN	F	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.773	H	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.774	F	F	Br	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.775	F	F	C≡CH	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.776	CF ₃	Cl	H	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.777	F	F	I	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.778	F	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.779	Cl	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.780	Br	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.781	CN	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.782	CH ₃	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.783	F	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.784	Cl	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.785	F	H	H	Cl	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.786	Cl	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.787	CN	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.788	F	H	H	CN	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.789	CN	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.790	F	H	F	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.791	Cl	H	F	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.792	CN	H	F	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.793	F	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.794	Cl	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -	

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.795	F	Cl	F	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.796	Cl	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.797	CN	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.798	F	CN	F	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.799	CN	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.800	F	F	H	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.801	Cl	F	H	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.802	F	Cl	H	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.803	CN	F	H	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.804	F	CN	H	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.805	F	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.806	Cl	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.807	F	Cl	F	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.808	CN	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.809	F	CN	F	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.810	H	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.811	F	F	Br	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.812	F	F	C≡CH	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.813	CF ₃	Cl	H	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.814	F	F	I	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.815	F	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.816	Cl	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.817	Br	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.818	CN	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.819	CH ₃	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.820	F	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.821	Cl	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.822	F	H	H	Cl	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.823	Cl	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.824	CN	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.825	F	H	H	CN	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.826	CN	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -	

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.827	F	H	F	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.828	Cl	H	F	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.829	CN	H	F	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.830	F	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.831	Cl	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.832	F	Cl	F	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.833	Cl	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.834	CN	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.835	F	CN	F	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.836	CN	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.837	F	F	H	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.838	Cl	F	H	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.839	F	Cl	H	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.840	CN	F	H	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.841	F	CN	H	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.842	F	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.843	Cl	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.844	F	Cl	F	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.845	CN	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.846	F	CN	F	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.847	H	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.848	F	F	Br	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.849	F	F	C≡CH	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.850	CF ₃	Cl	H	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.851	F	F	I	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.852	F	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.853	Cl	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.854	Br	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.855	CN	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.856	CH ₃	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.857	F	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.858	Cl	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.859	F	H	H	Cl	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.860	Cl	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.861	CN	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.862	F	H	H	CN	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.863	CN	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.864	F	H	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.865	Cl	H	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.866	CN	H	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.867	F	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.868	Cl	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.869	F	Cl	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.870	Cl	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.871	CN	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.872	F	CN	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.873	CN	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.874	F	F	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.875	Cl	F	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.876	F	Cl	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.877	CN	F	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.878	F	CN	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.879	F	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.880	Cl	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.881	F	Cl	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.882	CN	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.883	F	CN	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.884	H	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.885	F	F	Br	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.886	F	F	C≡CH	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.887	CF ₃	Cl	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.888	F	F	I	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -	
I.a.889	F	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.890	Cl	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.891	Br	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.892	CN	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.893	CH ₃	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.894	F	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.895	Cl	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.896	F	H	H	Cl	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.897	Cl	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.898	CN	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.899	F	H	H	CN	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.900	CN	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.901	F	H	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.902	Cl	H	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.903	CN	H	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.904	F	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.905	Cl	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.906	F	Cl	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.907	Cl	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.908	CN	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.909	F	CN	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.910	CN	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.911	F	F	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.912	Cl	F	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.913	F	Cl	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.914	CN	F	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.915	F	CN	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.916	F	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.917	Cl	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.918	F	Cl	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.919	CN	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.920	F	CN	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.921	H	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.922	F	F	Br	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.923	F	F	C≡CH	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.924	CF ₃	Cl	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.925	F	F	I	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -	
I.a.926	F	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.927	Cl	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.928	Br	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.929	CN	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.930	CH ₃	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.931	F	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.932	Cl	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.933	F	H	H	Cl	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.934	Cl	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.935	CN	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.936	F	H	H	CN	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.937	CN	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.938	F	H	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.939	Cl	H	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.940	CN	H	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.941	F	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.942	Cl	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.943	F	Cl	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.944	Cl	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.945	CN	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.946	F	CN	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.947	CN	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.948	F	F	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.949	Cl	F	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.950	F	Cl	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.951	CN	F	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.952	F	CN	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.953	F	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.954	Cl	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.955	F	Cl	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.956	CN	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.957	F	CN	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.958	H	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.959	F	F	Br	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.960	F	F	C≡CH	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.961	CF ₃	Cl	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.962	F	F	I	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -	
I.a.963	F	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.964	Cl	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.965	Br	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.966	CN	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.967	CH ₃	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.968	F	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.969	Cl	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.970	F	H	H	Cl	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.971	Cl	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.972	CN	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.973	F	H	H	CN	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.974	CN	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.975	F	H	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.976	Cl	H	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.977	CN	H	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.978	F	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.979	Cl	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.980	F	Cl	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.981	Cl	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.982	CN	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.983	F	CN	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.984	CN	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.985	F	F	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.986	Cl	F	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.987	F	Cl	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.988	CN	F	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.989	F	CN	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.990	F	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.991	Cl	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.992	F	Cl	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.993	CN	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.994	F	CN	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.995	H	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.996	F	F	Br	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.997	F	F	C≡CH	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.998	CF ₃	Cl	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.999	F	F	I	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
I.a.1000	F	H	H	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1001	Cl	H	H	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1002	Br	H	H	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1003	CN	H	H	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1004	CH ₃	H	H	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1005	F	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1006	Cl	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1007	F	H	H	Cl	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1008	Cl	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1009	CN	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1010	F	H	H	CN	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1011	CN	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1012	F	H	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1013	Cl	H	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1014	CN	H	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1015	F	F	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1016	Cl	F	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1017	F	Cl	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1018	Cl	F	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.1019	CN	F	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1020	F	CN	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1021	CN	F	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1022	F	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1023	Cl	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1024	F	Cl	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1025	CN	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1026	F	CN	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1027	F	F	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1028	Cl	F	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1029	F	Cl	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1030	CN	F	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1031	F	CN	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1032	H	F	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1033	F	F	Br	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1034	F	F	C≡CH	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1035	CF ₃	Cl	H	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1036	F	F	I	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
I.a.1037	F	H	H	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1038	Cl	H	H	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1039	Br	H	H	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1040	CN	H	H	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1041	CH ₃	H	H	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1042	F	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1043	Cl	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1044	F	H	H	Cl	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1045	Cl	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1046	CN	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1047	F	H	H	CN	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1048	CN	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1049	F	H	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1050	Cl	H	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.1051	CN	H	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1052	F	F	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1053	Cl	F	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1054	F	Cl	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1055	Cl	F	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1056	CN	F	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1057	F	CN	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1058	CN	F	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1059	F	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1060	Cl	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1061	F	Cl	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1062	CN	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1063	F	CN	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1064	F	F	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1065	Cl	F	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1066	F	Cl	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1067	CN	F	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1068	F	CN	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1069	H	F	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1070	F	F	Br	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1071	F	F	C≡CH	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1072	CF ₃	Cl	H	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1073	F	F	I	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
I.a.1074	F	H	H	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1075	Cl	H	H	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1076	Br	H	H	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1077	CN	H	H	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1078	CH ₃	H	H	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1079	F	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1080	Cl	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1081	F	H	H	Cl	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1082	Cl	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.1083	CN	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1084	F	H	H	CN	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1085	CN	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1086	F	H	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1087	Cl	H	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1088	CN	H	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1089	F	F	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1090	Cl	F	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1091	F	Cl	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1092	Cl	F	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1093	CN	F	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1094	F	CN	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1095	CN	F	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1096	F	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1097	Cl	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1098	F	Cl	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1099	CN	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1100	F	CN	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1101	F	F	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1102	Cl	F	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1103	F	Cl	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1104	CN	F	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1105	F	CN	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1106	H	F	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1107	F	F	Br	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1108	F	F	C≡CH	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1109	CF ₃	Cl	H	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1110	F	F	I	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
I.a.1111	F	H	H	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1112	Cl	H	H	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1113	Br	H	H	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1114	CN	H	H	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.1115	CH ₃	H	H	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1116	F	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1117	Cl	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1118	F	H	H	Cl	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1119	Cl	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1120	CN	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1121	F	H	H	CN	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1122	CN	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1123	F	H	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1124	Cl	H	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1125	CN	H	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1126	F	F	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1127	Cl	F	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1128	F	Cl	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1129	Cl	F	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1130	CN	F	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1131	F	CN	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1132	CN	F	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1133	F	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1134	Cl	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1135	F	Cl	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1136	CN	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1137	F	CN	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1138	F	F	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1139	Cl	F	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1140	F	Cl	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1141	CN	F	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1142	F	CN	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1143	H	F	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1144	F	F	Br	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1145	F	F	C≡CH	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1146	CF ₃	Cl	H	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.1147	F	F	I	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1148	F	H	H	H	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1149	Cl	H	H	H	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1150	Br	H	H	H	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1151	CN	H	H	H	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1152	CH ₃	H	H	H	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1153	F	H	H	F	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1154	Cl	H	H	F	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1155	F	H	H	Cl	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1156	Cl	H	H	F	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1157	CN	H	H	F	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1158	F	H	H	CN	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1159	CN	H	H	F	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1160	F	H	F	H	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1161	Cl	H	F	H	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1162	CN	H	F	H	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1163	F	F	F	H	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1164	Cl	F	F	H	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1165	F	Cl	F	H	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1166	Cl	F	F	H	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1167	CN	F	F	H	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1168	F	CN	F	H	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1169	CN	F	F	H	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1170	F	F	H	F	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1171	Cl	F	H	F	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1172	F	Cl	H	F	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1173	CN	F	H	F	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1174	F	CN	H	F	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1175	F	F	F	F	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1176	Cl	F	F	F	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1177	F	Cl	F	F	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1178	CN	F	F	F	F	Cl	CH ₃	H

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.1179	F	CN	F	F	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1180	H	F	F	F	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1181	F	F	Br	F	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1182	F	F	C≡CH	F	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1183	CF ₃	Cl	H	H	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1184	F	F	I	F	F	Cl	CH ₃	H
I.a.1185	F	H	H	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1186	Cl	H	H	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1187	Br	H	H	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1188	CN	H	H	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1189	CH ₃	H	H	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1190	F	H	H	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1191	Cl	H	H	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1192	F	H	H	Cl	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1193	Cl	H	H	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1194	CN	H	H	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1195	F	H	H	CN	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1196	CN	H	H	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1197	F	H	F	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1198	Cl	H	F	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1199	CN	H	F	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1200	F	F	F	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1201	Cl	F	F	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1202	F	Cl	F	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1203	Cl	F	F	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1204	CN	F	F	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1205	F	CN	F	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1206	CN	F	F	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1207	F	F	H	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1208	Cl	F	H	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1209	F	Cl	H	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1210	CN	F	H	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.1211	F	CN	H	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1212	F	F	F	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1213	Cl	F	F	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1214	F	Cl	F	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1215	CN	F	F	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1216	F	CN	F	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1217	H	F	F	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1218	F	F	Br	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1219	F	F	C≡CH	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1220	CF ₃	Cl	H	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1221	F	F	I	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1222	F	H	H	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1223	Cl	H	H	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1224	Br	H	H	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1225	CN	H	H	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1226	CH ₃	H	H	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1227	F	H	H	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1228	Cl	H	H	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1229	F	H	H	Cl	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1230	Cl	H	H	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1231	CN	H	H	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1232	F	H	H	CN	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1233	CN	H	H	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1234	F	H	F	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1235	Cl	H	F	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1236	CN	H	F	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1237	F	F	F	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1238	Cl	F	F	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1239	F	Cl	F	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1240	Cl	F	F	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1241	CN	F	F	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1242	F	CN	F	H	F	CN	CH ₃	CH ₃

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.1243	CN	F	F	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1244	F	F	H	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1245	Cl	F	H	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1246	F	Cl	H	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1247	CN	F	H	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1248	F	CN	H	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1249	F	F	F	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1250	Cl	F	F	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1251	F	Cl	F	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1252	CN	F	F	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1253	F	CN	F	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1254	H	F	F	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1255	F	F	Br	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1256	F	F	C≡CH	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1257	CF ₃	Cl	H	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1258	F	F	I	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1259	F	H	H	H	F	OCH ₃	H	H
I.a.1260	Cl	H	H	H	F	OCH ₃	H	H
I.a.1261	Br	H	H	H	F	OCH ₃	H	H
I.a.1262	CN	H	H	H	F	OCH ₃	H	H
I.a.1263	CH ₃	H	H	H	F	OCH ₃	H	H
I.a.1264	F	H	H	F	F	OCH ₃	H	H
I.a.1265	Cl	H	H	F	F	OCH ₃	H	H
I.a.1266	F	H	H	Cl	F	OCH ₃	H	H
I.a.1267	Cl	H	H	F	F	OCH ₃	H	H
I.a.1268	CN	H	H	F	F	OCH ₃	H	H
I.a.1269	F	H	H	CN	F	OCH ₃	H	H
I.a.1270	CN	H	H	F	F	OCH ₃	H	H
I.a.1271	F	H	F	H	F	OCH ₃	H	H
I.a.1272	Cl	H	F	H	F	OCH ₃	H	H
I.a.1273	CN	H	F	H	F	OCH ₃	H	H
I.a.1274	F	F	F	H	F	OCH ₃	H	H

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.1275	Cl	F	F	H	F	OCH ₃	H	H
I.a.1276	F	Cl	F	H	F	OCH ₃	H	H
I.a.1277	Cl	F	F	H	F	OCH ₃	H	H
I.a.1278	CN	F	F	H	F	OCH ₃	H	H
I.a.1279	F	CN	F	H	F	OCH ₃	H	H
I.a.1280	CN	F	F	H	F	OCH ₃	H	H
I.a.1281	F	F	H	F	F	OCH ₃	H	H
I.a.1282	Cl	F	H	F	F	OCH ₃	H	H
I.a.1283	F	Cl	H	F	F	OCH ₃	H	H
I.a.1284	CN	F	H	F	F	OCH ₃	H	H
I.a.1285	F	CN	H	F	F	OCH ₃	H	H
I.a.1286	F	F	F	F	F	OCH ₃	H	H
I.a.1287	Cl	F	F	F	F	OCH ₃	H	H
I.a.1288	F	Cl	F	F	F	OCH ₃	H	H
I.a.1289	CN	F	F	F	F	OCH ₃	H	H
I.a.1290	F	CN	F	F	F	OCH ₃	H	H
I.a.1291	H	F	F	F	F	OCH ₃	H	H
I.a.1292	F	F	Br	F	F	OCH ₃	H	H
I.a.1293	F	F	C≡CH	F	F	OCH ₃	H	H
I.a.1294	CF ₃	Cl	H	H	F	OCH ₃	H	H
I.a.1295	F	F	I	F	F	OCH ₃	H	H
I.a.1296	F	H	H	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1297	Cl	H	H	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1298	Br	H	H	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1299	CN	H	H	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1300	CH ₃	H	H	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1301	F	H	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1302	Cl	H	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1303	F	H	H	Cl	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1304	Cl	H	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1305	CN	H	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1306	F	H	H	CN	F	OCH ₃	CH ₃	H

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.1307	CN	H	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1308	F	H	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1309	Cl	H	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1310	CN	H	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1311	F	F	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1312	Cl	F	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1313	F	Cl	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1314	Cl	F	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1315	CN	F	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1316	F	CN	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1317	CN	F	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1318	F	F	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1319	Cl	F	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1320	F	Cl	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1321	CN	F	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1322	F	CN	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1323	F	F	F	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1324	Cl	F	F	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1325	F	Cl	F	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1326	CN	F	F	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1327	F	CN	F	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1328	H	F	F	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1329	F	F	Br	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1330	F	F	C≡CH	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1331	CF ₃	Cl	H	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1332	F	F	I	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
I.a.1333	F	H	H	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1334	Cl	H	H	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1335	Br	H	H	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1336	CN	H	H	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1337	CH ₃	H	H	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1338	F	H	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.1339	Cl	H	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1340	F	H	H	Cl	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1341	Cl	H	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1342	CN	H	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1343	F	H	H	CN	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1344	CN	H	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1345	F	H	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1346	Cl	H	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1347	CN	H	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1348	F	F	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1349	Cl	F	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1350	F	Cl	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1351	Cl	F	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1352	CN	F	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1353	F	CN	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1354	CN	F	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1355	F	F	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1356	Cl	F	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1357	F	Cl	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1358	CN	F	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1359	F	CN	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1360	F	F	F	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1361	Cl	F	F	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1362	F	Cl	F	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1363	CN	F	F	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1364	F	CN	F	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1365	H	F	F	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1366	F	F	Br	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1367	F	F	C≡CH	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1368	CF ₃	Cl	H	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1369	F	F	I	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
I.a.1370	F	H	H	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.1371	Cl	H	H	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1372	Br	H	H	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1373	CN	H	H	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1374	CH ₃	H	H	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1375	F	H	H	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1376	Cl	H	H	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1377	F	H	H	Cl	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1378	Cl	H	H	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1379	CN	H	H	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1380	F	H	H	CN	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1381	CN	H	H	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1382	F	H	F	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1383	Cl	H	F	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1384	CN	H	F	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1385	F	F	F	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1386	Cl	F	F	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1387	F	Cl	F	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1388	Cl	F	F	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1389	CN	F	F	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1390	F	CN	F	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1391	CN	F	F	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1392	F	F	H	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1393	Cl	F	H	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1394	F	Cl	H	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1395	CN	F	H	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1396	F	CN	H	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1397	F	F	F	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1398	Cl	F	F	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1399	F	Cl	F	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1400	CN	F	F	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1401	F	CN	F	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1402	H	F	F	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
I.a.1403	F	F	Br	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1404	F	F	C≡CH	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1405	CF ₃	Cl	H	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
I.a.1406	F	F	I	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	

Гербицидные соединения, применимые по настоящему изобретению, могут также использоваться в сочетании с дополнительными гербицидами, к которым злаковая культура обычно устойчива или приобрела устойчивость в результате мутагенеза как описано выше или приобрела устойчивость в результате экспрессии одного или более дополнительных трансгенов как описано выше. Гербициды, применимые по настоящему изобретению, обычно лучше всего используются в сочетании с одним или более другими гербицидами для борьбы с большим количеством видов нежелательной растительности. При использовании в сочетании с другими гербицидами (далее по тексту именуемыми «соединение В»), заявленные в настоящем изобретении соединения могут быть использоваться в одной препаративной форме с другим гербицидом или гербицидами, в виде баковой смеси с другим гербицидом или гербицидами или использованы последовательно с другим гербицидом или гербицидами.

В частности, дополнительное гербицидное соединение В выбирают из гербицидов класса b1) - b15):

- b1) ингибиторы биосинтеза липидов;
- b2) ингибиторы ацетолактат синтазы (ингибиторы ALS);
- b3) ингибиторы фотосинтеза;
- b4) ингибиторы протопорфириноген-IX оксидазы,
- b5) отбеливающие гербициды;
- b6) ингибиторы энолпирувилшикимат 3-фосфат-синтазы (ингибиторы EPSP);
- b7) ингибиторы глутаминсинтетазы;
- b8) ингибиторы 7,8-дигидроптероатсинтазы (ингибиторы DHP);
- b9) ингибиторы митоза;
- b10) ингибиторы синтеза очень длинноцепочных жирных кислот (VLCFA ингибиторы);
- b11) ингибиторы биосинтеза целлюлозы;

- b12) разобшающие гербициды;
- b13) ауксиновые гербициды;
- b14) ингибиторы транспорта ауксинов; и

b15) другие гербициды, выбранные из группы, включающей бромобутид, хлорфлуренол, хлорфлуренол-метил, цинметилин, кумилурон, далапон, дазомет, дифензокват, дифензокват-метилсульфат, диметипин, DSMA (ДНАМ, двунатриевый арсенат метила), димрон, эндотал и его соли, этобензанид, флампроп, флампроп-изопропил, флампроп-метил, флампроп-М-изопропил, флампроп-М-метил, флуренол, флуренол-бутил, флурпримидол, фосамин, фосамин-аммоний, инданофан, индазифлам, гидразид малеиновой кислоты, мефлуидид, метам, метиозолин (CAS 403640-27-7) метилазид, метилбромид, метил-димрон, метилйодид, MSMA (ММНА), олеиновая кислота, оксазикломефон, пеларгоновая кислота, пирибутикарб, хинокламин, триазифлам, тридифан, и 6-хлор-3-(2-циклопропил-6-метилфеноксид)-4-пиридазинол (CAS 499223-49-3), а также его соли и сложные эфиры;

включая их агрономически допустимые соли или производные соединения, такие как простые и сложные эфиры или амиды.

Предпочтительными являются композиции в соответствии с настоящим изобретением, содержащие, по меньшей мере, один гербицид В, выбранный из гербицидов классов b1, b6, b9, b10 и b11.

Далее приведены примеры гербицидов В, которые могут быть использованы в сочетании с соединениями формулы (I) в соответствии с настоящим изобретением:

- b1) из группы ингибиторов биосинтеза липидов:

АСС-гербициды, такие как аллоксидим, аллоксидим-натрий, бутроксидим, клетодим, клодинафоп, клодинафоп-пропаргил, циклоксидим, цигалофоп, цигалофоп-бутил, диклофоп, диклофоп-метил, феноксапроп, феноксапроп-этил, феноксапроп-Р, феноксапроп-Р-этил, флуазифоп, флуазифоп-бутил, флуазифоп-Р, флуазифоп-Р-бутил, галоксифоп, галоксифоп-метил, галоксифоп-Р, галоксифоп-Р-метил, метамифоп, пиноксаден, профоксидим, пропаквизафоп, квизалофоп, квизалофоп-этил, квизалофоп-тефурил, квизалофоп-Р, квизалофоп-Р-этил, квизалофоп-Р-тефурил, сетоксидим, тепралоксидим и тралкоксидим,

4-(4'-хлор-4-циклопропил-2'-фтор[1,1'-бифенил]-3-ил)-5-гидрокси-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3(6Н)-он (CAS 1312337-72-6); 4-(2',4'-дихлор-4-циклопропил[1,1'-бифенил]-3-ил)-5-гидрокси-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3(6Н)-он (CAS 1312337-45-3); 4-(4'-хлор-4-этил-2'-фтор[1,1'-бифенил]-3-ил)-5-гидрокси-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3(6Н)-он (CAS 1033757-93-5); 4-(2',4'-дихлор-4-этил[1,1'-бифенил]-3-ил)-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3,5(4Н,6Н)-дион(CAS 1312340-84-3); 5-(ацетилокси)-4-(4'-хлор-4-циклопропил-2'-фтор[1,1'-бифенил]-3-ил)-3,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3-он (CAS 1312337-48-6); 5-(ацетилокси)-4-(2',4'-дихлор-4-циклопропил-[1,1'-бифенил]-3-ил)-3,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3-он; 5-(ацетилокси)-4-(4'-хлор-4-этил-2'-фтор[1,1'-бифенил]-3-ил)-3,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3-он (CAS 1312340-82-1); 5-(ацетилокси)-4-(2',4'-дихлор-4-этил[1,1'-бифенил]-3-ил)-3,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3-он (CAS 1033760-55-2); 4-(4'-хлор-4-циклопропил-2'-фтор[1,1'-бифенил]-3-ил)-5,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-5-оксо-2Н-пиран-3-ил метилэфир угольной кислоты (CAS 1312337-51-1); 4-(2',4'-дихлор-4-циклопропил-[1,1'-бифенил]-3-ил)-5,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-5-оксо-2Н-пиран-3-ил метилэфир угольной кислоты; 4-(4'-хлор-4-этил-2'-фтор[1,1'-бифенил]-3-ил)-5,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-5-оксо-2Н-пиран-3-ил метилэфир угольной кислоты (CAS 1312340-83-2); 4-(2',4'-дихлор-4-этил[1,1'-бифенил]-3-ил)-5,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-5-оксо-2Н-пиран-3-ил метилэфир угольной кислоты (CAS 1033760-58-5); и не-АСС-гербициды, такие как бенфурезат, бутилат, циклоат, далапон, димепиперат, ЕРТС, эспрокарб, этофумезат, флупропанат, молинат, орбенкарб, пебулат, просульфокарб, трехосновная карбоновая кислота, тиобенкарб, тиокарбазил, триллат и вернолат;

b2) из группы ингибиторов ALS:

производные сульфонилмочевины, такие как амидосульфурон, азимсульфурон, бенсульфурон, бенсульфурон-метил, хлоримурон, хлоримурон-этил, хлорсульфурон, циносульфурон, циклосульфурон, этаметсульфурон, этаметсульфурон-метил, этоксисульфурон, флазасульфурон, флуцетосульфурон, флупирсульфурон, флупирсульфурон-метил-натрий, форамсульфурон, галосульфурон, галосульфурон-метил, имазосульфурон, йодосульфурон, йодосульфурон-метил-натрий, иофенсульфурон, иофенсульфурон-натрий, мезосульфурон, метаозосульфурон, метосульфурон, метосульфурон-метил, никосульфурон, ортосульфамурон, оксасульфурон, примисульфурон,

примисульфурон-метил, пропирисульфурон, процильфурон, пиразосульфурон, пиразосульфурон-этил, римсульфурон, сульфометурон, сульфометурон-метил, сульфосульфурон, тифенсульфурон, тифенсульфурон-метил, триацильфурон, трибенурон, трибенурон-метил, торифлоксисульфурон, трифлусульфурон, трифлусульфурон-метил и тритосульфурон,

имидазолиноны, такие как имазаметабенз, имазаметабенз-метил, имазамокс, имазапик, имазапир, имазахин и имазетапир, гербициды группы триазолопиримидина и сульфонанилиды, такие как хлорансулам, хлорансулам-метил, диклосулам, флуметсулам, флорасулам, метосулам, пеноксулам, пиримисульфам и пироксулам,

пиримидинилбензоаты, такие как биспирибак, биспирибак-натрий, пирибензоксим, пирифталид, пириминобак, пириминобак-метил, пиритиобак, пиритиобак-натрий, 4-[[[2-[(4,6-диметокси-2-пиримидинил)окси]фенил]метил]-амино]-бензойной кислоты-1-метилэтиловый эфир (CAS 420138-41-6), 4-[[[2-[(4,6-диметокси-2-пиримидинил)окси]фенил]метил]амино]-бензойной кислоты пропиловый эфир (CAS 420138-40-5), N-(4-бромфенил)-2-[(4,6-диметокси-2-пиримидинил)окси]бензолметанамин (CAS 420138-01-8),

гербициды класса сульфониламинокарбонил-триазолинона, такие как флукарбазон, флукарбазон-натрий, пропоксикарбазон, пропоксикарбазон-натрий, тиенкарбазон и тиенкарбазон-метил; и триафамон;

в том числе, предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к таким композициям, содержащим, по меньшей мере, один гербицид из группы имидазолинонов;

б3) из группы ингибиторов фотосинтеза:

амикарбазон, ингибиторы фотосистемы II, например, гербициды группы триазинов, включая хлортриазин, триазины, триазиндионы, метилтиотриазины и пиридазины, такие как аметрин, атразин, хлоридазон, цианазин, десметрин, диметаметрин, гексазинов, метрибузин, прометон, прометрин, пропазин, симазин, симетрин, тербуметон, тербутилазин, тербутрин и триэтазин, арилмочевины, такие как хлорбромурон, хлортолурон, хлорксурон, димефурон, диурон, флуометурон, изопротурон, изоурон, линурон, метамитрон, метабензтиазурон, метобензурон, метоксурон, монолинурон, небурон, сидурон, тебутиурон и тиадиазурон, фенилкарбаматы, такие как десмедифам, карбутилат, фенмедифам, фенмедифам-этил, нитриловые гербициды, такие как бромфеноксим, бромоксинил и его соли и

сложные эфиры, иоксинил и его соли и сложные эфиры, урацилы, такие как бромацил, ленацил и тербацил, и бентазон и бентазон-натрий, пиридат, пиридафол, пентанохлор и пропанил и ингибиторы фотосистемы I такие как дикват, дикват-дибромид, паракват, паракват-дихлорид и паракват-диметилсульфат. В том числе, предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к таким композициям, содержащим, по меньшей мере, один гербицид, производное арилмочевины; В том числе, таким же образом, предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к таким композициям, содержащим, по меньшей мере, один гербицид группы триазинов. В том числе, таким же образом, предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к таким композициям, содержащим, по меньшей мере, один гербицид группы нитрилов;

b4) из группы ингибиторов протопорфириноген-IX оксидазы:

ацифлуорфен, ацифлуорфен-натрий, азафенидин, бенкарбазон, бензфендизон, бифенокс, бутафенацил, карфентразон, карфентразон-этил, хлometоксифен, цинидон-этил, флуазолат, флуфенпир, флуфенпир-этил, флумиклорак, флумиклорак-пентил, флумиоксазин, фторгликофен, фторгликофен-этил, флутиацет, флутиацет-метил, фомесафен, галосафен, лактофен, оксадиаргил, оксадиазон, оксифлуорфен, пентоксазон, профлуазол, пираклонил, пирафлуфен, пирафлуфен-этил, сафлуфенацил, сульфентразон, тидиазимин, тиафенацил, этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)фенокси]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6; S-3100), N-этил-3-(2,6-дихлор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1*H*-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452098-92-9), N-тетрагидрофурфурил-3-(2,6-дихлор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1*H*-пиразол-1-карбоксамид (CAS 915396-43-9), N-этил-3-(2-хлор-6-фтор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1*H*-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452099-05-7), N-тетрагидрофурфурил-3-(2-хлор-6-фтор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1*H*-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452100-03-7), 3-[7-фтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2*H*-бензо[1,4]оксазин-6-ил]-1,5-диметил-6-тиоксо-[1,3,5]триазиан-2,4-дион, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2*H*-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), 2-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-проп-2-инил-3,4-дигидро-2*H*-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-изоиндол-1,3-дион, 1-метил-6-трифторметил-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-проп-2-инил-3,4-дигидро-2*H*-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-1*H*-пиримидин-2,4-дион, метил (*E*)-4-[2-хлор-5-[4-хлор-5-

(дифторметокси)-1*H*-метил-пиразол-3-ил]-4-фтор-феноксид]-3-метокси-бут-2-еноат [CAS 948893-00-3], и 3-[7-хлор-5-фтор-2-(трифторметил)-1*H*-бензимидазол-4-ил]-1-метил-6-(трифторметил)-1*H*-пиримидин-2,4-дион (CAS 212754-02-4);

b5) из группы отбеливающих гербицидов:

ингибиторы фитоен десатуразы (PDS): бефлубутамид, дифлуфеникан, флуридон, фторхлоридон, флуртамон, норфлуразон, пиколинафен и 4-(3-трифторметилфеноксид)-2-(4-трифторметилфенил)пиримидин (CAS 180608-33-7), ингибиторы HPPD: бензобиклон, бензофенап, кломазон, изоксафлутол, мезотрион, пирасульфотол, пиразолинат, пиразоксифен, сулькотрион, тефурилтрион, темботрион, топрамезон и бициклопирон, гербицид-отбеливатель, целевой фермент неизвестен: аклонифен, амитрол и флуметурон;

b6) из группы ингибиторов EPSP синтазы:

глифосат, глифосат-изопропиламмоний, глифосат-калий и глифосат-тримезиум (сульфосат);

b7) из группы ингибиторов глутамин-синтазы:

биланафос (биалафос), биланафос-натрий, глюфосинат, глюфосинат-Р и глюфосинат-аммоний;

b8) из группы ингибиторов DHP синтазы:

асулам;

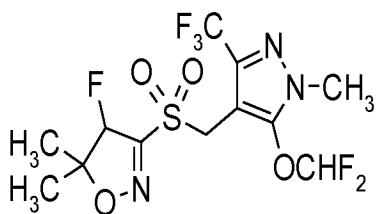
b9) из группы ингибиторов митоза:

соединения группы K1: динитроанилины, такие как бенфлуралин, бутралин, динитрамин, эталфлуралин, флухлоралин, оризалин, пендиметалин, продиамин и трифлуралин, фосфорамидаты, такие как ампрофос, ампрофос-метил и бутамифос, гербициды, производные бензойной кислоты, такие как хлортал, хлортал-диметил, пиридины, такие как дитиопир и тиазопир, бензамиды, такие как пропизамид и тебутам; соединения группы K2: хлорпрофам, профам и карбетамид, в том числе, соединения группы K1, в частности, динитроанилины являются предпочтительными;

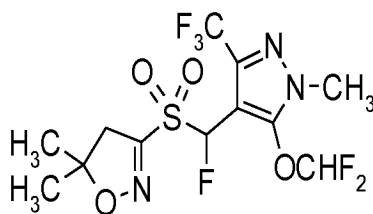
b10) из группы ингибиторов синтеза очень длинноцепочных жирных кислот (VLCFA ингибиторов):

хлорацетамиды, такие как ацетохлор, алахлор, бутахлор, диметахлор, диметенамид, диметенамид-Р, метазахлор, метолахлор, метолахлор-S, пентоксамид, претилахлор, пропахлор, пропизохлор и тенихлор, оксиацетанилиды, такие как флуфенацет и мефенацет, ацетанилиды, такие как дифенамид,

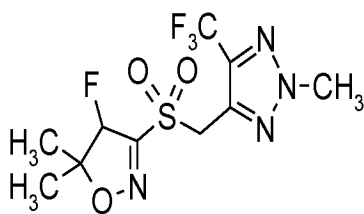
напроанилид, напроамид и напроамид-М, тетразолины, такие как фентразамид и другие гербициды, такие как анилофос, кафенстрол, феноксасульффон, ипфенкарбазон, пиперофос, пироксасульффон соединения формул II.1, II.2, II.3, II.4, II.5, II.6, II.7, II.8 и II.9



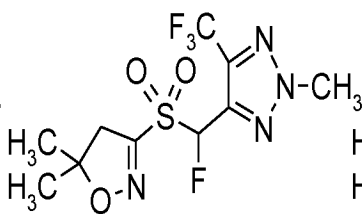
II.1



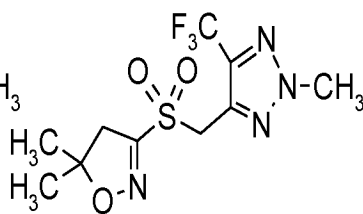
II.2



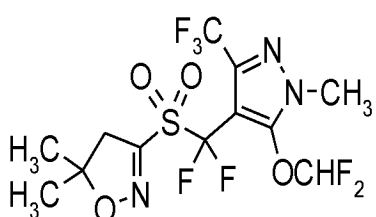
II.3



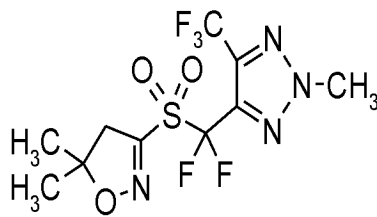
II.4



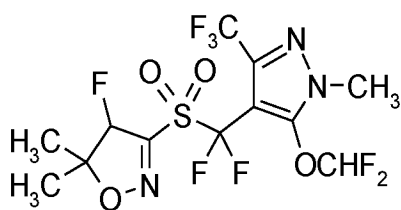
II.5



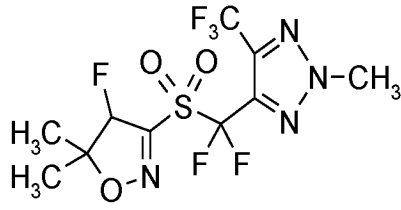
II.6



II.7



II.8



II.9

соединения изоксазолина по формуле (I)I известны специалистам, например, из документов WO 2006/024820, WO 2006/037945, WO 2007/071900 и WO 2007/096576;

среди VLCFA ингибиторов, предпочтительными являются хлорацетамиды и оксиацетамиды;

b11) из группы ингибиторов биосинтеза целлюлозы:

хлортиамид, дихлобенил, флупоксам, изоксабен и 1-циклогексил-5-пентафторфенилокси-1⁴-[1,2,4,6]тиатриазин-3-иламин;

b12) из группы разобщающих гербицидов:

диносеб, динотерб и динитро-о-крезол (DNOC) и его соли;

b13) из группы ауксиновых гербицидов:

2,4-D и его соли и сложные эфиры, такие как клацифос, 2,4-DB и его соли и сложные эфиры, аминокциклопирахлор и его соли и сложные эфиры, аминокпиралид и его соли, такие как аминокпиралид-диметиламмоний, аминокпиралид-трис(2-гидроксипропил)аммоний и его сложные эфиры, беназолин, беназолин-этил, хлорамбен и его соли и сложные эфиры, кломепроп, клопиралид и его соли и сложные эфиры, дикамба и его соли и сложные эфиры, дихлорпроп и его соли и сложные эфиры, дихлорпроп-Р и его соли и сложные эфиры, флуороксибир, флуороксибир-бутометил, флуороксибир-метил, галауоксифен и его соли и сложные эфиры (CAS 943832-60-8); МСРА (2-метил-4-хлорфеноксиуксусная кислота) и ее соли и сложные эфиры, МСРА-тиоэтил, МСРВ (2-метил-4-хлорфеноксиизобутановая кислота) и ее соли и сложные эфиры, мекопроп и его соли и сложные эфиры, мекопроп-Р и его соли и сложные эфиры, пиклорам и его соли и сложные эфиры, квинклолак, квинмерак, трибутиламин (ТБА) (2,3,6) и его соли и сложные эфиры и триклопир и его соли и сложные эфиры;

b14) из группы ингибиторов транспорта ауксинов: дифлуфензопир, дифлуфензопир-натрий, напалам и напалам-натрий;

b15) из группы других гербицидов: бромобутид, хлорфлуренол, хлорфлуренол-метил, цинметилин, кумилурон, циклопириморат (CAS 499223-49-3) и его соли и сложные эфиры, далапон, дазомет, дифензокват, дифензокват-метилсульфат, диметипин, DSMA (ДНАМ, двунатриевый арсенат метила), димрон, эндотал и его соли, этобензанид, флампроп, флампроп-изопропил, флампроп-метил, флампроп-М-изопропил, флампроп-М-метил, флуренол, флуренол-бутил, флурпримидол, фосамин, фосамин-аммоний, инданофан, индазифлам, гидразид малеиновой кислоты, мефлуидид, метам, метиозолин (CAS 403640-27-7) метилазид, метилбромид, метил-димрон, метилйодид, MSMA (ММНА), олеиновая кислота, оксацикломефон, пеларгоновая кислота, пирибутикарб, хинокламин, триазифлам, тридифан.

Активные соединения типа В и С, в составе которых имеется карбоксильная группа, могут применяться в виде кислоты, в виде подходящей для сельскохозяйственных целей соли, как указано выше, или в виде агрономически допустимого производного соединения в композициях по изобретению.

В случае с веществом дикамба, подходящие соли включают те, в которых противоион является агрономически допустимым катионом. Например, среди подходящих солей дикамба дикамба-натрий, дикамба-калий, дикамба-метиламмоний, дикамба-диметиламмоний, дикамба-изопропиламмоний, дикамба-дигликоламин, дикамба-оламин, дикамба-диоламин, дикамба-троламин, дикамба-N,N-бис-(3-аминопропил)метиламин и дикамба-диэтиленетриамин. Примеры подходящих сложных эфиров включают дикамба-метил и дикамба-бутотил.

Подходящими солями 2,4-D являются 2,4-D-аммоний, 2,4-D-диметиламмоний, 2,4-D-диэтиламмоний, 2,4-D-диэтанолламмоний (2,4-D-диоламин), 2,4-D-триэтанолламмоний, 2,4-D-изопропиламмоний, 2,4-D-триизопропанолламмоний, 2,4-D-гептиламмоний, 2,4-D-додециламмоний, 2,4-D-тетрадециламмоний, 2,4-D-триэтиламмоний, 2,4-D-трис(2-гидроксипропил)-аммоний, 2,4-D-трис(изопропил)аммоний, 2,4-D-троламин, 2,4-D-литий, 2,4-D-натрий. Примерами подходящих сложных эфиров 2,4-D являются 2,4-D-бутотил, 2,4-D-2-бутоксипропил, 2,4-D-3-бутоксипропил, 2,4-D-бутил, 2,4-D-этил, 2,4-D-этилгексил, 2,4-D-изобутил, 2,4-D-изооктил, 2,4-D-изопропил, 2,4-D-мептил, 2,4-D-метил, 2,4-D-октил, 2,4-D-пентил, 2,4-D-пропил, 2,4-D-тефурил и клацифос.

Подходящими солями 2,4-DB являются, например, 2,4-DB-натрий, 2,4-DB-калий и 2,4-DB-диметиламмоний. Подходящими сложными эфирами 2,4-DB являются, например, 2,4-DB-бутил и 2,4-DB-изоктил.

Подходящими солями дихлорпропа являются, например, дихлорпроп-натрий, дихлорпроп-калий и дихлорпроп-диметиламмоний. Среди примеров подходящих сложных эфиров дихлорпропа можно привести дихлорпроп-бутотил и дихлорпроп-изоктил.

Подходящие соли и сложные эфиры МСРА включают МСРА-бутотил, МСРА-бутил, МСРА-диметиламмоний, МСРА-диоламин, МСРА-этил, МСРА-тиоэтил, МСРА-2-этилгексил, МСРА-изобутил, МСРА-изоктил, МСРА-изопропил, МСРА-изопропиламмоний, МСРА-метил, МСРА-оламин, МСРА-калий, МСРА-

натрий и МСРА-троламин.

Подходящей солью МХФБ является МХФБ натрий. Подходящим сложным эфиром МСРВ является МСРВ-этил.

Подходящие соли клопиралида – это клопиралид-калий, клопиралид-оламин и клопиралид-трис-(2-гидроксипропил)аммоний. Среди примеров подходящих сложных эфиров клопиралида можно привести клопиралид-метил.

Примерами подходящего сложного эфира флуроксипира являются флуроксипир-метил и флуроксипир-2-бутоксипир-1-метилэтил, при этом предпочтение отдается флуроксипир-метилу.

Подходящими солями пиклорама являются пиклорам-диметиламмоний, пиклорам-калий, пиклорам-триизопропаноламмоний, пиклорам-триизопропиламмоний и пиклорам-троламин. Подходящим сложным эфиром пиклорама является пиклорам-изоктил.

Подходящей солью триклопира является триклопир-триэтиламмоний. Подходящими сложными эфирами триклопира являются, например, триклопир-этил и триклопир-бутотил.

Подходящими солями и сложными эфирами хлорамбена являются хлорамбен-аммоний, хлорамбен-диоламин, хлорамбен-метил, хлорамбен-метиламмоний и хлорамбен-натрий. Подходящие соли и сложные эфиры 2,3,6-ТБА включают 2,3,6-ТБА-диметиламмоний, 2,3,6-ТБА-литий, 2,3,6-ТБА-калий и 2,3,6-ТБА-натрий.

Подходящие соли и сложные эфиры аминопиралида включают аминопиралид-калий аминопиралид-диметиламмоний, и аминопиралид-трис(2-гидроксипропил)аммоний.

Подходящими солями глифосата являются, например, глифосат-аммоний, глифосат-диаммоний, глифосат-диметиламмоний, глифосат-изопропиламмоний, глифосат-калий, глифосат-натрий, глифосат-тримезиум, а также соли этаноламина и диэтанолamina, предпочтительно глифосат-диаммоний, глифосат-изопропиламмоний и глифосат-тримезиум (сульфосат).

Подходящей солью глюфосината является, например, глюфосинат-аммоний.

Подходящей солью глюфосината-Р является, например, глюфосинат-Р-аммоний.

Подходящие соли и сложные эфиры бромоксонила включают, например, бромоксинил-бутират, бромоксинил-гептаноат, бромоксинил-октаноат, бромоксинил-калий и бромоксинил-натрий.

Подходящие соли и сложные эфиры иоксонила включают, например, иоксинил-октаноат, иоксинил-калий и иоксинил-натрий.

Подходящие соли и сложные эфиры мекопропа включают мекопроп-бутотил, мекопроп-диметиламмоний, мекопроп-диоламин, мекопроп-этадил, мекопроп-2-этилгексил, мекопроп-изоктил, мекопроп-метил, мекопроп-калий, мекопроп-натрий и мекопроп-троламин.

Подходящие соли мекопропа-Р включают, например, мекопроп-Р-бутотил, мекопроп-Р-диметиламмоний, мекопроп-Р-2-этилгексил, мекопроп-Р-изобутил, мекопроп-Р-калий и мекопроп-Р-натрий.

Подходящей солью дифлуфензопира является, например, дифлуфензопир-натрий.

Подходящей солью нафталама является, например, нафталам-натрий.

Подходящими солями и сложными эфирами аминоклопирахлора являются, например, аминоклопирахлор-диметиламмоний, аминоклопирахлор-метил, аминоклопирахлор-триизопропаноламмоний, аминоклопирахлор-натрий и аминоклопирахлор-калий.

Подходящей солью хинклорака является, например, хинклорак-диметиламмоний.

Подходящей солью квинмерака является, например, квинмерак-диметиламмоний.

Подходящей солью имазамокса является, например, имазамокс-аммоний.

Подходящими солями имазапика являются, например, имазапик-аммоний и имазапик-изопропиламмоний.

Подходящими солями имазапира являются, например, имазапир-аммоний и имазапир-изопропиламмоний.

Подходящей солью имазакина является, например, имазаквин-аммоний.

Подходящими солями имазетапира являются, например, имазетапир-аммоний и имазетапир-изопропиламмоний.

Подходящей солью топрамезона является, например, топрамезон-натрий.

Особенно предпочтительными гербицидными соединениями В являются гербициды В, как определено выше; в частности, гербициды В.1 - В.189, перечисленные ниже в Таблице В:

Таблица В:

	Гербицид В
В.1	клетодим
В.2	клодинафоп-пропаргил
В.3	циклоксдим
В.4	цигалофоп-бутил
В.5	фенксапроп-этил
В.6	фенксапроп-Р-этил
В.7	метаифоп
В.8	пиноксаден
В.9	профоксидим
В.10	сетоксидим
В.11	тепралоксидим
В.12	тралкоксидим
В.13	эспрокарб
В.14	этофумезат
В.15	молинат
В.16	просульфокарб
В.17	тиобенкарб
В.18	триаллат
В.19	бенсульфурон-метил
В.20	биспирибак-натрий
В.21	клорансулам-метил
В.22	хлорсульфурон
В.23	хлоримурон
В.24	циклосульфамурон
В.25	диклосулам
В.26	флорасулам
В.27	флуметсулам
В.28	флупирсульфурон-метил- натрий
В.29	форамсульфурон
В.30	имазамокс
В.31	имазамокс-аммоний

	Гербицид В
В.32	имазапик
В.33	имазапик-аммоний
В.34	имазапик-изопропиламмоний
В.35	имазапир
В.36	имазапир-аммоний
В.37	имазапир-изопропиламмоний
В.38	имазаквин
В.39	имазаквин-аммоний
В.40	имазетапир
В.41	имазетапир-аммоний
В.42	имазетапир- изопропиламмоний
В.43	имазосульфурон
В.44	йодсульфурон-метил-натрий
В.45	иофенсульфурон
В.46	иофенсульфурон-натрий
В.47	мезосульфурон-метил
В.48	метазосульфурон
В.49	бенсульфурон-метил
В.50	метосулам
В.51	никосульфурон
В.52	пеносулам
В.53	пропоксикарбазон-натрий
В.54	пиразосульфурон-этил
В.55	пирибензоксим
В.56	пирифталид
В.57	пироксулам
В.58	пропирисульфурон
В.59	римсульфурон
В.60	сульфосульфурон
В.61	тиенкарбазон-метил
В.62	трифенсульфурон-метил
В.63	трибенурон-метил

	Гербицид В
В.64	тритосульфурон
В.65	триафамон
В.66	аметрин
В.67	атразин
В.68	бентазон
В.69	бромксинил
В.70	бромоксинил-октаноат
В.71	бромксинил-гептаноат
В.72	бромоксинил-калий
В.73	Диурон
В.74	флуометурон
В.75	гексазинон
В.76	изопротурон
В.77	линурон
В.78	метамитрон
В.79	метрибузин
В.80	пропанил
В.81	симазин
В.82	тербутилазин
В.83	тербутрин
В.84	паракват-дихлорид
В.85	ацифторфен
В.86	бутафенацил
В.87	карфентразон-этил
В.88	флумиоксазин
В.89	фомезафен
В.90	оксадиаргил
В.91	оксифторфен
В.92	сафлуфенацил
В.93	сульфентразон

	Гербицид В
В.94	этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диохо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)фенокси]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6)
В.95	1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[<i>b</i>][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4)
В.96	бензобициклоп
В.97	кломазон
В.98	дифлуфеникан
В.99	флуорохлоридон
В.100	изоксафлутол
В.101	мезотрион
В.102	норфлуразон
В.103	пиколинафен
В.104	сулькотрион
В.105	тефурилтрион
В.106	темботрион
В.107	топрамезон
В.108	топрамезон-натрий
В.109	бициклопирон
В.110	амитрол
В.111	флуометурон
В.112	фенквинтрион
В.113	глифосат
В.114	глифосат-аммоний
В.115	глифосат-диметиламмоний

	Гербицид В
В.116	глифосат-изопропиламмоний
В.117	глифосат-тримезиум (сульфосат)
В.118	глифосат-калий
В.119	глюфосинат
В.120	глюфосинат-аммоний
В.121	глюфосинат-Р
В.122	глюфосинат-Р-аммоний
В.123	пендиметалин
В.124	трифлуралин
В.125	ацетохлор
В.126	бутахлор
В.127	кафенстрол
В.128	диметенамид-Р
В.129	фентразамид
В.130	флуфенацет
В.131	мефенацет
В.132	метазахлор
В.133	метолахлор
В.134	S-метолахлор
В.135	претилахлор
В.136	феноксасульффон
В.137	изоксабен
В.138	ипфенкарбазон
В.139	пироксасульффон
В.140	2,4-D
В.141	2,4-D-изобутил
В.142	2,4-D-диметиламмоний
В.143	2,4-D-N,N,N- триметилэтанолламмоний
В.144	аминопиралид
В.145	аминопиралид-метил

	Гербицид В
В.146	аминопиралид- диметиламмоний
В.147	аминопиралид-трис(2- гидроксипропил)аммоний
В.148	клопиралид
В.149	клопиралид-метил
В.150	клопиралид-оламин
В.151	дикамба
В.152	дикамба-бутотил
В.153	дикамба-дигликоамин
В.154	дикамба-диметиламмоний
В.155	дикамба-диоламин
В.156	дикамба-изопропиламмоний
В.157	дикамба-калий
В.158	дикамба-натрий
В.159	дикамба-троламин
В.160	дикамба-N,N-бис-(3- аминопропил)метиламин
В.161	дикамба-диэтилентриамин
В.162	флуроксипир
В.163	флорксипир-мептил
В.164	МХФУ
В.165	МХФУ-2-этилгексил
В.166	МСРА-диметиламмоний
В.167	хинклорак
В.168	хинклорак-диметиламмоний
В.169	хинмерак
В.170	квинмерак-диметиламмоний
В.171	аминоциклопирахлор
В.172	аминоциклопирахлор-калий
В.173	аминоциклопирахлор-метил
В.174	дифлуфензопир
В.175	дифлуфензопир-натрий

	Гербицид В
В.176	димрон
В.177	инданофан
В.178	индазифлам
В.179	оксацикломефон
В.180	триазифлам
В.181	П.1
В.182	П.2
В.183	П.3
В.184	П.4
В.185	П.5
В.186	П.6
В.187	П.7
В.188	П.8
В.189	П.9

Более того, целесообразно использовать соединения формулы (I) в комбинации с антидотами и, при необходимости, с одним или несколькими другими гербицидами. Антидоты – это химические соединения, предотвращающие или уменьшающие повреждения полезных растений, при этом не оказывая значительного влияния на гербицидное действие соединений формулы (I) на нежелательные растения. Они могут применяться либо перед посевом (например, при обработке семян, побегов или сеянцев) или в предвсходовый или послевсходовый период соответствующих растений. Антидоты и соединения формулы (I) и, при необходимости, гербициды В могут быть использованы одновременно или по очереди.

Подходящими антидотами являются, например, (хинолин-8-окси)уксусные кислоты, 1-фенил-5-галогеналкил-1Н-1,2,4-триазол-3-карбоновые кислоты, 1-фенил-4,5-дигидро-5-алкил-1Н-пиразол-3,5-дикарбоновые кислоты, 4,5-дигидро-5,5-диарил-3-изоксазол карбоновые кислоты, дихлорацетамиды, альфа-оксиминофенилацетонитрилы, ацетофеноноксиды, 4,6-дигалоген-2-фенилпиримидины, N-[[4-(аминокарбонил)фенил]сульфонил]-2-бензойные амиды, 1,8-нафтоный ангидрид, 2-галло-4-(галогеналкил)-5-тиазолкарбоновые кислоты, фосфотиоаты и N-алкил-О-фенилкарбаматы и их агрономически допустимые соли, а также их агрономически допустимые производные, такие как амиды, сложные эфиры и тиоэфиры при наличии кислотной группы.

Примерами предпочтительных антидотов С являются беноксакор, клоквинтоцет, циометринил, ципросульфамид, дихлормид, дициклонон, диэтолат, фенхлоразол, фенклорим, флуразол, флуксофенил, фурилазол, изоксацифен, мефенпир, мефенат, нафтоный ангидрид, оксабетринил, 4-(дихлорацетил)-1-окса-4-азаспиро[4.5]декан (MON4660, CAS 71526-07-3), 2,2,5-триметил-3-(дихлорацетил)-1,3-оксазолидин (R-29148, CAS 52836-31-4) и N-(2-метоксибензоил)-4-[(метиламинокарбонил)амино]бензолсульфонамид (CAS 129531-12-0).

Особенно предпочтительными антидотами С являются следующие соединения С.1 – С.17

С.1	беноксакор
С.3	клоквинтоцет-мексил

С.2	клоквинтоцет
С.4	ципросульфамид

C.5	дихлормид	C.6	фенхлоразол
C.7	фенхлоразол-этил	C.8	фенклорим
C.9	фурилазол	C.10	изоксадифен
C.11	изоксадифен-этил	C.12	мефенпир
C.13	мефенпир-диэтил	C.14	ангидрид нафтойной кислоты
C.15	4-(дихлорацетил)-1-окса-4-азаспиро[4.5]декан	C.16	2,2,5-триметил-3-(дихлорацетил)-1,3-оксазолидин
C.17	N-(2-метоксибензоил)-4-[(метиламинокарбонил)амино]бензилсульфонамид		

Активные соединения В групп b1) – b15) и соединения-антидоты С являются известными гербицидами и антидотами, см., например, The Compendium of Pesticide Common Names (<http://www.alanwood.net/pesticides/>); Farm Chemicals Handbook 2000 том 86, Meister Publishing Company, 2000; B. Hock, C. Fedtke, R. R. Schmidt, Herbicide [Гербициды], Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1995; W. H. Ahrens, Herbicide Handbook, 7-ое издание, Weed Science Society of America, 1994; и К. К. Hatzios, Herbicide Handbook, Дополнение к 7-му изданию, Weed Science Society of America, 1998. 2,2,5-триметил-3-(дихлорацетил)-1,3-оксазолидин [CAS No. 52836-31-4] также известен как R-29148. 4-(дихлорацетил)-1-окса-4-азаспиро[4.5]декан [CAS No. 71526-07-3] также известен как AD-67 и MON 4660.

Объяснение соответствующих механизмов действия активных соединений основано на современном уровне знаний. При применимости нескольких механизмов действия к одному активному соединению данное вещество приписывали только одному механизму действия.

В целом предпочтительно использовать соединения по изобретению в комбинации с гербицидами, которые являются селективными для интересующих культур и которые дополняют спектр сорняков, с которыми борются эти соединения при данной дозе внесения. Также в целом предпочтительно применять соединения по изобретению и другие дополнительные гербициды одновременно в виде комбинированного состава или баковой смеси.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу определения гербицида с использованием TriA мутировавшего типа,

кодированной нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или ее вариант или производное.

Данный способ включает следующие этапы:

- a) получение трансгенной клетки или растения с нуклеиновой кислотой, кодирующей мутированную TriA, где мутированная TriA экспрессирована;
- b) применение гербицида к трансгенной клетке или растению a) и к контрольной клетке или растению того же вида;
- c) определение роста или жизнеспособности трансгенной и контрольной клетки или растения после применения указанного гербицида, и
- d) отбор «гербицидов», которые привели к уменьшению роста контрольной клетки или растения по сравнению с ростом трансгенной клетки или растения.

Как описано выше, настоящее изобретение предоставляет информацию о композициях и способах повышения устойчивости сельскохозяйственного растения или семени по сравнению с растением или семенем дикого типа. В предпочтительном варианте осуществления изобретения устойчивость сельскохозяйственного растения или семени повышается так, что растение или семя может противостоять применению гербицида в количестве предпочтительно 1 - 1000 г аи/га⁻¹, более предпочтительно 1 - 200 г аи/га⁻¹, еще более предпочтительно 5 - 150 г аи/га⁻¹ и наиболее предпочтительно 10 - 100 г аи/га⁻¹. При использовании по тексту настоящего документа, «устойчивость» к гербициду означает, что растение либо не гибнет, либо лишь частично повреждается в результате такого применения. Специалисту известно, что дозы внесения могут варьироваться в зависимости от условий окружающей среды, таких как температура и влажность, а также в зависимости от выбранного типа гербицида (активный ингредиент, ai).

В способах борьбы с сорняками после появления всходов, которые могут применяться в различных вариантах осуществления изобретения, используют дозы внесения >0,3х гербицидов; в некоторых вариантах осуществления такие дозировки могут составлять, например, приблизительно >0,3х, >0,4х, >0,5х, >0,6х, >0,7х, >0,8х, >0,9х или >1х гербицидов. В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения растения устойчивые к гербицидам по настоящему изобретению обладают устойчивостью при внесении гербицидов после появления

всходов в количествах приблизительно 25 - 200 г ай/га. В некоторых вариантах осуществления, когда растением устойчивым к гербицидам является двудольное растение (например, соя, хлопок), гербициды вносятся после появления всходов в количествах приблизительно 50 г ай/га. В других вариантах осуществления, когда растением устойчивым к гербицидам является однодольное растение (например, кукуруза, рис, сорго), гербициды вносятся после появления всходов в количествах приблизительно 200 г ай/га. В других вариантах осуществления, когда растением устойчивым к гербицидам является Brassica (например, канола), гербициды вносятся после появления всходов в количествах приблизительно 25 г ай/га. При использовании способов борьбы с сорняками после появления всходов по настоящему изобретению, в некоторых вариантах осуществления дозировки гербицидов могут применяться приблизительно через 7 – 10 дней после появления всходов. В соответствии с другим вариантом осуществления доза внесения гербицидов может превышать 1х дозы внесения гербициды; в некоторых вариантах осуществления доза внесения гербицидов может составлять 4х, тем не менее, как правило, доза внесения будет составлять приблизительно 2,5х или менее или приблизительно 2х или менее или приблизительно 1х или менее дозы внесения гербициды.

Кроме того, настоящее изобретение предоставляет способы, которые включают использование, по меньшей мере, одного гербицида, при необходимости с одним или несколькими гербицидными соединениями В, и в некоторых случаях антидотом С в соответствии с подробным определением выше.

В этих методах гербицид может применяться любым методом, известным специалистам, включая, помимо прочего, обработку семян, почвы и листьев. До применения гербицид можно преобразовать в стандартные препаративные формы, например, растворы, эмульсии, суспензии, пылевидные составы, порошки, пасты и гранулы. Выбор формы использования зависит от конкретной цели; в любом случае, она должна обеспечивать качественное и равномерное распределение соединения в соответствии с изобретением.

Получив растения с повышенной устойчивостью к гербициду можно использовать большое разнообразие соединений для защиты растений от сорняков, чтобы таким образом улучшить рост растений и уменьшить борьбу за питательные вещества. Гербицид может использоваться для контроля над сорняками до всхода,

после всхода, до посева и во время выращивания сельскохозяйственных культур, описанных в настоящем документе, в районах их произрастания, или могут быть использованы препараты, содержащие гербицид и другие добавки. Гербициды могут также использоваться для обработки семян. Добавки в гербицидах включают другие гербициды, детергенты, адъюванты, лиофилизирующие агенты, склеивающие агенты, стабилизирующие агенты и другие, подобные вещества. Препаративные формы гербицида могут представлять собой влажные или сухие препараты и включать, помимо прочего, сыпучие порошки, концентраты эмульсии и жидкие концентраты. Гербицид и гербицидные препараты можно применять в соответствии со стандартными методами, например, путем обрызгивания, орошения, опыления или другими подобными методами.

Подходящие препаративные формы подробно описаны в РСТ/ЕР2009/063387 и РСТ/ЕР2009/063386, которые включены в настоящую заявку посредством ссылки.

Как описано в настоящем документе, нуклеиновые кислоты TrtA по настоящему изобретению могут быть использованы в повышении устойчивости к гербицидам растений, включающих в своих геномах ген, кодирующий РРО белок дикого типа или белок с мутированной TrtA, устойчивый к гербицидам. Этот ген может быть эндогенным или трансгенным в соответствии с описанием выше. Также в некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновые кислоты настоящего изобретения можно сгруппировать с любой комбинацией целевых полинуклеотидных последовательностей для создания растений с желаемым фенотипом. Например, нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению можно сгруппировать с помощью любых других полинуклеотидов, кодирующих полипептиды с пестицидной и/или инсектицидной активностью, таких, как, например, токсиновые белки *Bacillus thuringiensis* (описанные в патентах США №№ 5,366,892; 5,747,450; 5,737,514; 5,723,756; 5,593,881; и Geiser et al (1986) Gene 48: 109), 5-энолпирувилшикимат-3-фосфат синтаза (EPSPS), глифосат ацетилтрансфераза (GAT), цитохром P450 монооксигеназа, фосфинотрицин ацетилтрансфераза (PAT), синтаза ацетогидроксикислоты (AHAS; EC 4.1.3.18, также известна как ацетолактатсинтаза или ALS), гидроксифенилпируват диоксигеназа (HPPD), фитоендесатураза (PD), протопорфириноген оксидаза (PPO) и дикамба-разрушающие ферменты в соответствии с описанием в WO 02/068607,

или ферменты, разрушающие производные феноксиксусной и феноксипропионовой кислоты в соответствии с описанием в WO 2008141154 или WO 2005107437. Полученные комбинации могут также включать множественные копии любого из интересующих полинуклеотидов.

Следовательно, гербицидостойкие растения по настоящему изобретению могут быть использованы в сочетании с гербицидом, к которому они устойчивы. Растения по настоящему изобретению могут обрабатываться гербицидами с помощью любых известных специалистам способов. Гербициды могут применяться на любом этапе выращивания растений. Например, гербициды могут применяться на предпосадочном, посадочном, предвсходовом, послевсходовом этапе или на нескольких из них. Гербициды могут наноситься на семена и высушиваться для образования слоя на семенах.

В некоторых вариантах осуществления семена обрабатывают антидотом, после чего следует внесение гербицидов после появления всходов. В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения внесение гербицидов после появления всходов осуществляют приблизительно через 7 - 10 дней после посева обработанных антидотом семян. В некоторых вариантах осуществления антидотом является клоквинтоцет, дихлормид, флуксофеним или их комбинации.

Способы борьбы с сорняками или нежелательной растительностью

В соответствии с другими аспектами настоящим изобретением предоставляется способ борьбы с сорняками в месте произрастания растения или его части, при этом указанный способ включает: внесение композиции, содержащей гербицид в указанное место произрастания.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящим изобретением предоставляется способ борьбы с сорняками в месте произрастания растений, при этом указанный способ включает: внесение гербицидной композиции, содержащей гербициды, в место произрастания растений; при этом на указанном месте: (a) произрастает растение или посажено семя, способное развиваться в указанное растение; или (b) будет произрастать растение или будет посажено такое семя после внесения указанной гербицидной композиции; при этом указанные растение или семя, по меньшей мере, в некоторых своих клетках содержат полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растения,

при этом промотор способен экспрессировать полипептид мутированной Tg1A, кодированный указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида мутированной Tg1A придает указанному растению устойчивость к гербицидам.

Гербицидные композиции также могут применяться, например, для обработки листьев, обработки почвы, обработки семян или пропитывания почвы. Внесение может осуществляться путем опрыскивания, распыления, разбросного внесения или любым другим эффективным, известным в данной области, способом.

В одном варианте осуществления изобретения гербициды могут быть использованы для контроля за ростом сорняков, которые могут произрастать в непосредственной близости от гербицидостойких растений настоящего изобретения. В таких вариантах осуществления изобретения гербицид может вноситься на участок, на котором произрастают гербицидостойкие растения по изобретению в непосредственной близости от сорняков. Гербицид, к которому устойчиво гербицидостойкое растение по настоящему изобретению, может вноситься на участок в концентрации, достаточной для уничтожения или замедления роста сорняка. Специалистам известны указанные выше концентрации гербицида, достаточные для уничтожения или замедления роста сорняка.

В соответствии с другими вариантами осуществления настоящим изобретением предоставляется способ борьбы с сорняками, произрастающими вблизи растения, обладающего устойчивостью к гербицидам по изобретению. Данный способ включает применение эффективного количества гербицида в отношении сорняков и растений, стойких к ауксиновым гербицидам, причем растение имеет повышенную стойкость к ауксиновым гербицидам в сравнении с растением дикого типа. В некоторых вариантах осуществления растения, обладающие устойчивостью к гербицидам по изобретению являются предпочтительно сельскохозяйственными культурами, включающими, помимо прочего, подсолнечник люцерну, виды рода Brassica, сою, хлопок, сафлор, арахис, табак, томат, картофель, пшеницу, рис, маис, сорго, ячмень, рожь, просо и сорго.

В соответствии с другими аспектами гербицид(ы) (например, гербициды) могут также использоваться для обработки семян. В некоторых вариантах осуществления эффективная концентрация или эффективное количество

гербицида или гербицидов или композиция, содержащая гербицид или гербициды в эффективной концентрации или эффективное количество гербицида или гербицидов могут наноситься непосредственно на семена перед посевом или в ходе посева семян. Препаративные формы для обработки семян могут дополнительно содержать связующие вещества и, в некоторых случаях, красители.

Могут добавляться связующие вещества для улучшения адгезии активных материалов с семенами после обработки. В соответствии с другими вариантами осуществления подходящими связующими веществами являются ПАВ на основе блок-сополимеров этиленоксида и пропиленоксида, а также поливинилалкоголи, поливинилпирролидоны, полиакрилаты, полиметакрилаты, полибутены, полиизобутилены, полистирол, полиэтиленамины, полиэтиленамиды, полиэтиленимины (Lupasol(R), Polymin(R)), полиэфиры, полиуретаны, поливинилацетат, тилоза и сополимеры производные этих полимеров. В некоторых случаях, препаративная форма также может включать красители. Подходящими красителями или пигментами, которые могут быть использованы в препаратах для обработки семян, являются: Родамин В, С.I. красный пигмент 112, С.I. растворитель красный 1, синий пигмент 15:4, синий пигмент 15:3, синий пигмент 15:2, синий пигмент 15: 1, синий пигмент 80, желтый пигмент 1, желтый пигмент 13, красный пигмент 1 12, красный пигмент 48:2, красный пигмент 48: 1, красный пигмент 57: 1, красный пигмент 57:1, красный пигмент 53:1, оранжевый пигмент 43, оранжевый пигмент 34, оранжевый пигмент 5, зеленый пигмент 36, зеленый пигмент 7, белый пигмент 6, коричневый пигмент 25, базовый фиолетовый 10, базовый фиолетовый 49, кислотный красный 51, кислотный красный 52, кислотный красный 14, кислотный синий 9, кислотный желтый 23, базовый красный 10, базовый красный 108.

Термин «обработка семян» включает все соответствующие известные специалистам методы обработки семян, такие, например, как протравливание семян, нанесение покрытия на семена, опудривание семян, намачивание семян и гранулирование семян. В соответствии с одним из вариантов осуществления настоящим изобретением предоставляется способ обработки почвы путем внесения, в частности, в борозду для семян: гранулированного препарата, содержащего гербициды в качестве композиции/препарата (например, гранулированного препарата), в некоторых случаях, вместе с одним или

несколькими твердыми или жидкими агрономически приемлемыми носителями и/или, в некоторых случаях, вместе с одним или несколькими агрономически приемлемыми поверхностно-активными веществами. Этот способ преимущественно используют для обработки почвы, подготовленной для посева, например, зерновых культур, маиса, хлопка и подсолнечника.

Настоящее изобретение также включает семена, покрытые препаратами для обработки семян содержащие такие препараты, которые содержат гербициды и, по меньшей мере, еще один гербицид, такой как ингибитор AHAS, выбранный из группы, включающей амидосульфурон, азимсульфурон, бенсульфурон, хлоримурон, хлорсульфурон, циносульфурон, циклосульфамурон, этаметсульфурон, этоксисульфурон, флазасульфурон, флуцетосульфурон, флупирсульфурон, форамсульфурон, галосульфурон, имазосульфурон, йодосульфурон, мезосульфурон, метсульфурон, никосульфурон, оксасульфурон, примисульфурон, просульфурон, пиразосульфурон, римсульфурон, сульфометурон, сульфосульфурон, тифенсульфурон, триасульфурон, трибенурон, трифлорисульфурон, трифлусульфурон, тритосульфурон, имазаметабенз, имазамокс, имазапик, имазапир, имазаквин, имазетапир, хлорасулам, диклосулам, флорасулам, флуметсулам, метосулам, пеноксулам, биспирибак, пириминобак, пропоксикарбазон, флукарбазон, пирибензоксим, пирифталид и пиритиобак.

Термин «с нанесенным покрытием и/или содержащий», как правило, означает, что активный ингредиент находится по большей части на поверхности продукта для выращивания во время применения, тем не менее, большая или меньшая часть ингредиента может проникнуть внутрь продукта для выращивания, в зависимости от способа применения. При посадке (повторной посадке) продукта для выращивания активный ингредиент может им поглощаться.

В некоторых вариантах осуществления обработка семян гербицидами или препаратом, содержащим гербициды, производится путем распыления или покрытия семян, всходов или почвы перед или после засева растений или перед появлением или после появления растений.

В соответствии с другими вариантами осуществления изобретения при обработке семян соответствующие препараты применяют путем обработки семян эффективным количеством гербицида или препарата, содержащего гербицид.

В соответствии с другими аспектами настоящим изобретением предоставляется способ для борьбы с нежелательной растительностью или с сорняками, включающий контактирование семян растений устойчивых к гербицидам по настоящему изобретению с гербицидом перед посевом и/или после предварительного проращивания. Указанный способ может также включать посев семян, например, в почву на поле или в среду для пересадки в горшки в теплице. Такой способ особенно применим при борьбе с нежелательной растительностью или с сорняками в непосредственной близости от растения. Термин «борьба с нежелательной растительностью» подразумевает уничтожение сорняков и/или замедление или препятствование их нормальному росту. Под сорняками, в широком смысле, подразумевают все растения, растущие там, где это нежелательно.

Термин «сорняки» в соответствии с настоящим изобретением включает, например, двудольные и однодольные сорняки. Двудольные сорняки включают, помимо прочего, сорняки следующих родов: *Sinapis*, *Lepidium*, *Galium*, *Stellaria*, *Matricaria*, *Anthemis*, *Galinsoga*, *Chenopodium*, *Urtica*, *Senecio*, *Amaranthus*, *Portulaca*, *Xanthium*, *Convolvulus*, *Ipomoea*, *Polygonum*, *Sesbania*, *Ambrosia*, *Cirsium*, *Carduus*, *Sonchus*, *Solarium*, *Rorippa*, *Rotala*, *Lindernia*, *Lamium*, *Veronica*, *Abutilon*, *Emex*, *Datura*, *Viola*, *Galeopsis*, *Papaver*, *Centaurea*, *Trifolium*, *Ranunculus* и *Taraxacum*. Однодольные сорняки включают, помимо прочего, сорняки следующих родов: *Echinochloa*, *Setaria*, *Panicum*, *Digitaria*, *Phleum*, *Poa*, *Festuca*, *Eleusine*, *Brachiaria*, *Lolium*, *Bromus*, *Avena*, *Cyperus*, *Sorghum*, *Agropyron*, *Cynodon*, *Monochoria*, *Fimbristylis*, *Sagittaria*, *Eleocharis*, *Scirpus*, *Paspalum*, *Ischaemum*, *Sphenoclea*, *Dactyloctenium*, *Agrostis*, *Alopecurus* и *Apera*.

Кроме того, термин «сорняки» в соответствии с настоящим изобретением может включать, например, сельскохозяйственные культуры, растущие на нежелательном участке. Например, произвольно растущая кукуруза на поле, где главным образом растет соя, может считаться сорняком, если она там нежелательна.

В соответствии с другими вариантами осуществления изобретения при обработке семян соответствующие препараты применяют путем обработки семян эффективным количеством гербицида или препарата, содержащего гербицид.

В соответствии с другими аспектами обработка мест произрастания, растений, частей растений или семян по настоящему изобретению включает применение агрономически приемлемой композиции, не содержащей А.І. В соответствии с одним вариантом осуществления изобретения такая обработка включает применение агрономически приемлемой композиции, не содержащей гербицидов в качестве А.І. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения такая обработка включает применение агрономически приемлемой композиции, не содержащей гербицидов в качестве А.І., причем указанная композиция содержит один или более агрономически приемлемых носителей, разбавителей, вспомогательных веществ, регуляторов роста и других подобных веществ. В соответствии с другими вариантами осуществления изобретения обработка включает применение агрономически приемлемой композиции, не содержащей гербицидов в качестве активного ингредиента, причем указанная композиция содержит вспомогательное вещество. В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения указанным вспомогательным веществом является ПАВ, вещество, способствующее распределению активного ингредиента, адгезивный агент, пропитывающее вещество, агент для борьбы с уносом вещества, маслянистый концентрат, эмульгатор, агент, обеспечивающий совместимость, или комбинации указанных веществ.

Следует обратить внимание на то, что следующая информация относится к вариантам осуществления настоящего изобретения, и без отклонения от цели изобретения сюда могут быть внесены многочисленные изменения. Далее изобретение поясняется примерами, которые не должны подразумеваться как ограничивающие цель изобретения. В противном случае, следует понимать, что возможно прибегнуть к другим различным вариантам осуществления изобретения, модификациям и их эквивалентам, которые после прочтения могут пожелать использовать специалисты без отклонения от общего смысла настоящего изобретения и/или цели прилагаемых формул.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1: Бактериальные штаммы. При экспериментах по трансформации в качестве реципиента использовали химически компетентные образцы *Escherichia coli* TOP10 (Life Technologies; США) и BL21(DE3) Gold (Agilent Technologies; Германия). Трансформацию выполняли в соответствии с описанием в Maniatis *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; N.Y. (1982). *Agrobacterium tumefaciens* использовали для введения области Т-ДНК в *Arabidopsis*, кукурузу и сою.

Бактериальные культуры в повседневном режиме выращивали в бульоне Лурия (LB) или при 37°C в LB, смешанном с агаром (отношение веса к объему 15%). LB также при необходимости дополняли антибиотиком канамицином и/или хлорамфениколом. Плазмида ДНК была получена с использованием набора GeneJet Plasmid Miniprep (Thermo Scientific, США). TriA и ее варианты получали синтезом генов (Eurofins, Германия). Синтезированные гены, содержащие сайты рестрикции XhoI и NcoI, клонировали в вектор pET24d N-HIS, который обладает стойкостью к канамицину. Шаперонную плазмиду pGro7 (шапероны groEL и groES), обладающую стойкостью к хлорамфениколу, получили из TaKaRa (Япония).

ПРИМЕР 2: Синтез генов, расщепление рестрикционными ферментами и клонирование. Синтез генов и необходимое клонирование в вектор pMK-RQ выполнялись компанией Eurofins (Германия). Рестрикционные ферменты приобретали в новой Зеландии. Их использовали в соответствии с инструкциями производителя.

ПРИМЕР 3: Очистка белков. TriA и ее варианты получали в *E. coli* BL21(DE3) Gold (Agilent Technologies, Германия). Следовательно, *E. coli* трансформировали с использованием соответствующего вектора экспрессии метки pET24d N-HIS и шапероновой плазмиды pGro7 (шапероны groEL и groES). Бактериальные штаммы выращивали при температуре 30°C в 100 мл LB в течение 20 часов, а экспрессию белка индуцировали с использованием 0,1 ммоль IPTG при 25°C в течение 20 часов. Сбор клеток производили с помощью центрифугирования на скорости 3000 об/мин в теч. 20 мин. при температуре 4° C, после чего они были повторно помещены в реактив для извлечения белка «Биг Бастер» в соответствии с инструкцией производителя. Лизаты очищали центрифугированием. Образцы

бычьего сывороточного альбумина (5, 10 и 20 гр.) выгружали на каждый из исследуемых гелей с использованием денситометрии для определения внутреннего стандарта. Найденные параметры белков проверяли с использованием красителя белкового анализа в соответствии с инструкцией производителя (Thermo Scientific; США). Ферменты с меткой HIS очистили металл-аффинной хроматографией с использованием набора Ni-IDA 1000 (Macherey-Nagel, Германия) согласно инструкциям производителя. Чистоту белков оценивали при помощи SDS-PAGE с использованием готового заводского геля NuPAGE Novex 4-12% (Life Technologies; США, окрашенного с применением Coomassie Brilliant Blue (Serva, Германия). Концентрации белка оценивали посредством измерения коэффициента поглощения на 280 нм с использованием Lambda Bio+ (Perkin Elmer, США).

ПРИМЕР 4: Кинетика ферментов. Суспензию клеток в состоянии покоя, содержащую ген TrtA, инкубировали в различных азинах, меламине и атразине, а фильтрат культуры анализировали масс-спектрометрией СВЭЖХ высокого разрешения. Субстраты получали из Sigma-Aldrich или синтезировали самостоятельно. Синтетические стандарты и продукты реакции ферментов анализировали масс-спектрометрией СВЭЖХ высокого разрешения (Thermo/Dionex UPLC UltiMate3000 в сочетании с масс-спектрометром QExactive высокого разрешения). Использовали колонку Waters Acquity HSS T3 (2,1 мм; 100 мм; 1,8 мкмоль) с мобильной фазой вода/ацетонитрил (0,1% раствор муравьиной кислоты) со скоростью потока 0,6 мкл мин⁻¹. Использовали ферменты, растворенные в 25 ммоль буфера фосфата натрия (pH 7.2) с концентрацией субстрата в диапазоне от 1 нМ до 10 нМ при 30°C. Со временем первоначальный пик азинов исчез, тогда как количество образовавшегося ОН-метаболита (продукт реакции) увеличилось. Продукт был обнаружен посредством определения точной формулы и анализа точных фрагментов МС-МС. Более того, некоторые из образовавшихся продуктов по стандарту оригинала совместно элютировали. Степень разложения в % рассчитывали по клеткам, которые содержали пустой вектор в качестве контрольной группы. Результаты представлены в Таблице 3.

Мутиция	Меламин	6-циклопентил-N4-(2,3,4,5,6-пентафторфенил)-1,3,5-триазин-2,4-диамин
L92A	97	0
L92C	100	0
L92D	66	0
L92E	99	0
L92F	0	0
L92G	23	5
L92H	29	0
L92I	100	0
L92K	0	0
L92M	61	0
L92N	100	0
L92P	0	0
L92Q	100	16
L92R	0	0
L92S	98	93
L92T	100	83
L92V	100	10
L92W	0	0
L92Y	0	0
Y93A	97	0
Y93C	100	0
Y93D	23	0
Y93E	97	0
Y93F	100	0
Y93G	81	0
Y93H	100	9
Y93I	87	5
Y93K	3	0

Y93L	90	0
Y93M	80	0
Y93N	99	0
Y93P	0	1
Y93Q	92	8
Y93R	92	0
Y93S	20	0
Y93T	100	0
Y93V	86	0
Y93W	77	0
M155A	50	0
M155C	45	0
M155D	46	0
M155E	0	0
M155F	9	0
M155G	0	0
M155H	0	0
M155I	0	0
M155K	50	0
M155L	54	7
M155N	7	0
M155P	73	7
M155Q	66	0
M155R	0	0
M155S	31	0
M155T	73	0
M155V	44	0
M155W	0	0
M155Y	50	0
M157A	94	2
M157C	50	1
M157D	0	0
M157E	94	0

M157G	71	0
M157H	51	4
M157I	96	0
M157K	75	6
M157L	99	0
M157M	100	0
M157N	100	0
M157P	44	0
M157Q	100	0
M157R	100	0
M157S	53	0
M157T	100	0
M157V	100	0
M157W	100	0
M157Y	99	0

Мутация	Меламин	6-циклопентил-N4-(2,3,4,5,6-пентафторфенил)-1,3,5-триазин-2,4-диамин
L92CY93LM155TF157L	100	100
L92DY93LM155TF157L	100	100
L92EY93LM155TF157L	100	100
L92GY93LM155TF157L	100	100
L92HY93LM155TF157L	100	0
L92IY93LM155TF157L	100	0
L92MY93LM155TF157L	100	37
L92NY93LM155TF157L	100	100
L92PY93LM155TF157L	24	0
L92QY93LM155TF157L	100	100

L92SY93LM155TF157L	100	100
L92TY93LM155TF157L	100	100
L92VY93LM155TF157L	100	100
L92AY93AM155TF157L	100	100
L92AY93CM155TF157L	100	100
L92AY93EM155TF157L	100	100
L92AY93FM155TF157L	100	100
L92AY93GM155TF157L	100	100
L92AY93HM155TF157L	100	100
L92AY93IM155TF157L	100	100
L92AY93KM155TF157L	100	100
L92AY93MM155TF157L	100	100
L92AY93NM155TF157L	100	100
L92AY93QM155TF157L	100	100
L92AY93RM155TF157L	100	100
L92AY93SM155TF157L	99	99
L92AY93TM155TF157L	100	100
L92AY93VM155TF157L	100	100
L92AY93WM155TF157L	99	98
L92AY93LM155AF157L	99	100
L92AY93LM155CF157L	100	100
L92AY93LM155GF157L	100	100
L92AY93LM155HF157L	100	99
L92AY93LM155IF157L	99	100
L92AY93LM155KF157L	100	99
L92AY93LM155LF157L	100	100
L92AY93LM155NF157L	98	100
L92AY93LM155PF157L	100	100
L92AY93LM155QF157L	100	100
L92AY93LM155SF157L	100	100
L92AY93LM155VF157L	100	100
L92AY93LM155YF157L	100	74
L92AY93LM155TM157A	100	100

L92AY93LM155TM157C	100	100
L92AY93LM155TM157E	25	0
L92AY93LM155TM157G	96	99
L92AY93LM155TM157H	100	100
L92AY93LM155TM157I	100	100
L92AY93LM155TM157K	100	100
L92AY93LM155TM157M	100	100
L92AY93LM155TM157N	100	100
L92AY93LM155TM157Q	100	100
L92AY93LM155TM157R	100	100
L92AY93LM155TM157S	100	100
L92AY93LM155TM157T	100	100
L92AY93LM155TM157V	100	99
L92AY93LM155TM157W	100	100
L92AY93LM155TM157Y	100	100

ПРИМЕР 5: Направленная эволюция амидогидролазы. Азины поместили в активную область модели TrzA (на основании структуры кристалла TrzN и AtzA), разместив молекулы поверх меламина. Так были найдены радикалы, которые формируют активную область и связывающий карман для субстратов. Основные регионы, отвечающие за координацию иона металла в активной области; известные радикалы, значимые для активности амидогидролазы; радикалы, которые формируют гидрофобное «основание» активной области или являются значимыми для активности гидролазы при взаимодействиях с ароматическим кольцом субстрата, изменениям подвергнуты не были. Тем не менее, для расширения ферментного кармана были модифицированы аминокислоты. Эту модель использовали, с одной стороны, для предсказания аминокислотных мишеней за пределами активной области, которые могут в целом повлиять на способность к принятию триазинов, а, с другой стороны, модель применяли для нахождения аминокислот, которые занимают пространство в ферментном кармане, и которые могут быть замещены меньшими по размеру аминокислотами с аналогичной гидрофобностью, чтобы обеспечить наличие места для большего количества крупных азинов без изменения ферментной активности. Дополнительно был

проведен полный насыщающий мутагенез в предпочтительных положениях, включая 92, 93, 155 и 157. В некоторых положениях замещение аминокислоты значительно увеличивает активность амидогидролазы для крупных азинов.

Для тестирования стабильности и устойчивости фермента к протеазам растворы, содержащие белок TriA в 25 мМ фосфатном буфере (pH 7,2), смешивали с различной концентрацией протеазы или оставляли без обработки. В качестве протеазы использовали субтилизин А из *Bacillus licheniformis*, полученный от Sigma Aldrich. После периода инкубации эти растворы инкубировали с различными азинами, меламином или атразином и фильтрат анализировали в соответствии с описанием в Примере 4. Результаты представлены на Фиг. 2 и 3.

ПРИМЕР 6: Создание модельных растений с гербицидной устойчивостью. Конструирование растений *Arabidopsis* устойчивых к гербицидам класса азинов с последовательностями мутированной амидогидролазы. При трансформации *Arabidopsis thaliana*, последовательности амидогидролазы дикого типа или мутированной амидогидролазы на основе одной SEQ ID NO: 1, кодирующей SEQ ID NO:2, клонируют с использованием стандартных техник клонирования, как описано у Sambrook et al. (Molecular cloning (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press) в бинарный вектор, содержащий кассету маркерного гена устойчивости (AHAS) и мутировавшую последовательность амидогидролазы (маркированную как GOI) между убиквитиновым промотором (PcUbi) и терминаторной последовательностью нопалин синтазы (NOS). Для трансформации растения бинарные плазмиды интродуцируют в *Agrobacterium tumefaciens*. *Arabidopsis thaliana* трансформируют последовательностями мутированной амидогидролазы способом «цветочного погружения», как описано McElver and Singh (WO 2008/124495). Трансгенные растения *Arabidopsis* были подвергнуты анализу TaqMan для определения количества локусов интеграции.

ПРИМЕР 7: Проверка модельных растений с гербицидной устойчивостью. Для подбора растений *Arabidopsis thaliana*, стойких к азинам, используют экспрессирование TriA и ее вариантов. Проводили анализ выбранных линий *Arabidopsis thaliana* на наличие улучшенной устойчивости к азинам, таким как 6-циклопентил-N4-(2,3,4,5,6-пентафторфенил)-1,3,5-триазин-2,4-диамин в 48-луночных планшетах. Таким образом, семена T2 простерилизованы на поверхности путем перемешивания на протяжении 5 минут в растворе этанол - вода (70+30 по

объему), однократно промыты раствором этанол - вода (70+30 по объему) и дважды стерилизованной деионизированной водой. Семена повторно помещены в 0,1% агар, растворенный в воде (масса/объем). От четырех до пяти семян помещены в твердую питательную среду, состоящую из полуконцентрированного питательного раствора Мурасиге-Скуга, pH 5,8 (Murashige and Skoog (1962) *Physiologia Plantarum* 15: 473-497). Соединения растворены в диметилсульфоксиде (ДМСО) и добавлены к среде до момента затвердевания (конечная концентрация ДМСО 0,1%). Инкубирование на многолуночных планшетах осуществляют в камере роста при температуре 22°C, относительной влажности 75% и 110 $\mu\text{моль Phot} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ при 14: 10 часовой фотопериоде темнота/свет. Задержку роста оценивают через семь–десять дней после посева по сравнению с растениями дикого типа. Факторы устойчивости рассчитывают на основании значений IC₅₀ для подавления роста трансформированных растений *Arabidopsis* по сравнению с нетрансформированными. В дополнение трансгенные растения T2 или T3 *Arabidopsis* тестируют на повышенную устойчивость к гербицидам-ингибиторам биосинтеза целлюлозы в ходе исследований в теплице.

ПРИМЕР 8: Создание и испытание культур с гербицидной устойчивостью (соя и кукуруза). Бинарные векторы были получены в соответствии с описанием в ПРИМЕРЕ 9. Соя сорта Jake была трансформирована в соответствии с описанием в Siminszky et al., *Phytochem Rev.* 5:445-458 (2006). После регенерации трансформанты пересаживали в почву в маленьких горшочках, с помещением в камеры роста (16 ч. день/ 8 ч. ночь; 25°C днем/ 23°C ночью; 65% относительной влажности; 130-150 $\text{мЕ м}^{-2} \text{с}^{-1}$) и далее тестировали на присутствие Т-ДНК с помощью анализа Taqman. Спустя несколько недель, здоровые, трансгенные положительные, с единичной копией линии трансплантируют в более крупные горшки и выращивают в камере роста. Затем растения переносятся в теплицу для получения и сбора семян T1.

Оптимальная длина побега для срезания составляет порядка 3-4 дюймов, где должны присутствовать, по меньшей мере, два узла. Каждый отросток берут от исходного трансформанта (материнское растение) и погружают в порошок с гормоном, способствующим появлению корней (индол-3-масляная кислота, ИМК). Затем отросток помещают в среду Oasis Wedges внутри купола. Материнское растение развивалось до зрелости и использовалось для получения семян. Также

одновременно брали отростки дикого типа, которые служили для целей негативного контроля. Отростки хранят в биокуполе 5-7 дней. Через 7-10 дней после переноса в среду Oasis Wedges, корни обрабатывают гербицидом с помощью питательного раствора. Через 3-4 дня после обработки производится оценка типичных фитотоксических симптомов, таких как булабовидный корень. Трансгенные растения с меньшей степенью повреждения или без повреждений по сравнению с растениями дикого типа считаются растениями, обладающими устойчивостью к гербицидам.

В целях обработки до появления всходов в качестве контейнеров для посевов могут быть использованы пластиковые цветочные горшки, наполненные супесью с содержанием гумуса приблизительно 3,0%, который использовали в качестве субстрата. Семена испытуемых растений высеивают отдельно для каждого вида/события. Используемые активные ингредиенты, которые были суспендированы или эмульгированы в воде, вносятся непосредственно после посева с помощью сопел для мелкого распыления. Контейнеры орошают осторожно, чтобы обеспечить прорастание и рост и затем покрывают прозрачными пластиковыми навесами до тех пор, пока не появятся корни. Навес обеспечивает одинаковое прорастание тестовых растений до тех пор, пока не будут использованы гербициды.

Незрелые зародыши кукурузы трансформировали в соответствии с процедурой, описанной в работе Peng et al. (WO2006/136596). Растения тестировали на наличие Т-ДНК путем проведения анализа Taqman, при котором целью являлся pos-терминатор, присутствующий во всех конструктах. Растения без признаков поражения были отправлены в теплицу для закаливания и испытания обрызгиванием. Растения были по-отдельности пересажены в почву MetroMix 360 в 4-дюймовые горшки. После помещения в теплицу (цикл день/ночь при 27°C /21°C, продолжительность дня 14 часов, которая обеспечивалась за счет использования 600 Вт натриевых ламп высокого давления) они прорастали на протяжении 14 дней. Трансгенные растения кукурузы культивировали для получения семян T1 семена для тестирования устойчивости к гербицидам. Через 7 - 10 дней после переноса корни обрабатывают гербицидом с помощью питательного раствора. Через 3 - 4 дня после обработки производится оценка типичных фитотоксических симптомов, таких как булабовидный корень.

Трансгенные растения с меньшей степенью повреждения или без повреждений по сравнению с растениями дикого типа считаются растениями, обладающими устойчивостью к гербицидам.

В целях обработки до появления всходов в качестве контейнеров для посевов используют пластиковые цветочные горшки, наполненные супесью с содержанием гумуса приблизительно 3,0%, который использовали в качестве субстрата. Семена испытуемых растений высеивают отдельно для каждого вида/события. Используемые активные ингредиенты, которые были суспендированы или эмульгированы в воде, вносятся непосредственно после посева с помощью сопел для мелкого распыления. Контейнеры орошают осторожно, чтобы обеспечить прорастание и рост и затем покрывают прозрачными пластиковыми навесами до тех пор, пока не появятся корни. Навес обеспечивает одинаковое прорастание тестовых растений до тех пор, пока не будут использованы гербициды.

Для обработки после всходов растений тестовые растения сначала выращивают до высоты 3 - 15 см, в зависимости от характера растения, и только затем обрабатывают гербицидами. Для этой цели тестовые растения либо засеивают непосредственно в контейнеры и там же их выращивают, либо сначала их выращивают отдельно и трансплантируют в тестовые контейнеры за несколько дней до обработки. Оценка нанесения вреда гербицидами проводится спустя 2 и 3 недели после обработки. Нанесение вреда растению оценивают по шкале от 0% до 100%, где 0 означает отсутствие вреда, а 100% – полное уничтожение. 100 означает отсутствие прорастания растений или полное разрушение, по меньшей мере, находящихся на поверхности фрагментов, а 0 – это полное отсутствие повреждений или нормальный режим роста. Умеренная гербицидная активность представлена значениями, по меньшей мере, от 60, хорошая гербицидная активность представлена значениями, по меньшей мере, от 70, а очень хорошая гербицидная активность представлена значениями, по меньшей мере, от 85.

Семена T1 высевали в открытые плоские лотки с отверстиями в дне для дренирования. Плоские лотки были наполовину заполнены вермикулитом Palmetto Medium C-3. По этому слою были равномерно распределены шестьдесят семян, которые затем были покрыты еще одним слоем вермикулита. Лотки полили и поместили в теплицу в стандартные условия и в течение четырех дней

обеспечивали достаточный полив раствором воды и удобрения. Через четыре дня проросшие проростки удаляли из вермикулита, корни осторожно очищали от любых сред и помещали в стеклянную пробирку объемом 15 мл, заполненную 6-циклопентил-N4-(2,3,4,5,6-пентафторфенил)-1,3,5-триазин-2,4-диамином в деионизированной воде в соответствующей концентрации. В колпачке проделали небольшое отверстие, чтобы корень мог встать на место. Пробирки помещали в черный ящик с отверстием в верхней части для размещения пробирок объемом 15 мл и перед визуализацией выращивали в стандартных условиях для сои в камере для выращивания в течение пяти дней. Были сделаны цифровые изображения растений и производили оценку их устойчивости к обработке гербицидом. Устойчивость оценивали путем сравнения роста побегов и/или корня с нетрансформированными контрольными растения (дикого типа). Результат показаны на Фиг. 1.

ПРИМЕР 9: Поостроение бинарного вектора. Способы клонирования, например, использование рестрикционной эндонуклеазы для вырезания двухцепочечной ДНК в заданных областях, электрофореза в агарозном геле, очистки фрагментов ДНК, перенос нуклеиновых кислот на никтоцеллюлозные и нейлоновые мембраны, соединение фрагментов ДНК, трансформация клеток *E.coli* и культур бактерий выполняли в соответствии с описанием в Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87965-309-6). Реакцию цепочки полимеразы проводили с использованием высокоточной полимеразы ДНК Phusion™ (NEB, Франкфурт, Германия) в соответствии с инструкциями производителя. В целом праймеры, которые использовали в PCR, были сконструированы так, что, по меньшей мере, 20 нуклеотидов 3-го конца праймера идеально ренатурируют с шаблоном для расширения. Добавлены сайты рестрикции для прикрепления соответствующих нуклеотидов сайтов узнавания к 5-му концу праймера. Полимерную цепную реакцию синтеза, например, как описано в K. Heckman and L. R. Pease, *Nature Protocols* (2207) 2, 924–932, использовали в качестве альтернативного способа соединения двух целевых фрагментов, например, промотора к гену или гена к терминатору. Синтез генов, в соответствии с описанием, например, в работе Czar et al. (*Trends in Biotechnology*, 2009, 27(2): 63-72), выполнялся компанией Life Technologies с использованием их сервиса Geneart®.

Гены оценивали на предмет использования кодонов и присутствия сайтов рестрикции, которые могут помешать при проведении клонирования. При необходимости кодоны в генах были оптимизированы с использованием стандартных протоколов для максимальной экспрессии в культурном растении (например, см. Puigbo et al. 2007 и Gasper et al. 2012), а также для удаления нежелательных сайтов рестрикции. Гены были синтезированы компанией GeneArt (Регенсбург) или усилены цепной реакцией синтеза с использованием высокоточной полимеразы ДНК Phusion™ (NEB, Франкфурт, Германия) в соответствии с инструкциями производителя из кДНК. В обоих случаях вводили сайты рестрикции NcoI и/или AscI на 5'конце, а также сайт рестрикции SbfI на 3'конце, что обеспечивало клонирование данных генов между функциональными элементами, такими как промоторы и терминаторы, с использованием данных сайтов рестрикции. Модули промотор-терминатор или модули промотор-интрон-терминатор были созданы путем синтеза нуклеотидов. Во время присоединения терминаторных последовательностей к промоторным последовательностям или промотор-интронным последовательностям посредством синтеза в любую из сторон модуля добавляли распознающие последовательности рестрикционной эндонуклеазы, и между промотором и терминатором или между интроном и терминатором вводили сайты узнавания рестрикционной эндонуклеазы NcoI, AscI и SbfI. Для получения конечных модулей экспрессии усиленные реакцией ПЦР гены клонировали между промотором и терминатором или между интроном и терминатором через сайты рестрикции AscI и/или SbfI. Для трансформации в *E. coli* использовали полные бинарные векторы в соответствии с описанием в работе Sambrook et al. 1989.

В качестве альтернативы, синтез генов, описанный, например, в работе Czar et al. (Trends in Biotechnology, 2009, 27(2): 63-72), может выполняться компанией Life Technologies с использованием их сервиса Geneart®. Стандартные способы, такие как клонирование, рестрикция, молекулярный анализ, трансформация клеток *E.coli* и бактериальных культур, могут быть реализованы в соответствии с описанием в Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87965-309-6). Реакция цепочки полимеразы может проводиться с использованием высокоточной полимеразы ДНК Phusion™ (NEB, Франкфурт, Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Полимерная цепная реакция синтеза

может выполняться, как описано в K. Heckman and L. R. Pease, *Nature Protocols* (2207) 2, 924–932. В обоих случаях могут быть введены сайты рестрикции NcoI и/или AscI на 5-м конце, а также сайт рестрикции Pac I на 3-м конце, что обеспечивало клонирование данных генов между функциональными элементами. Модули промотор-терминатор или модули промотор-интрон-терминатор были созданы посредством полного синтеза компанией GeneArt (Регенсбург) или соединением соответствующих элементов экспрессии с использованием ПЦР синтеза и клонирования продукта ПЦР в ТОРО-вектор pCR2.1 (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Во время присоединения последовательностей терминаторов к последовательностям промоторов или промотор-интронным последовательностям посредством синтеза всей кассеты или с использованием ПЦР синтеза в любую из сторон модуля могут добавляться распознающие последовательности рестрикционной эндонуклеазы, сайты узнавания рестрикционной эндонуклеазы NcoI, AscI и PacI могут быть введены между промотором и терминатором или между интроном и терминатором. Для получения конечных модулей экспрессии усиленные реакцией ПЦР гены могут клонироваться между промотором и терминатором или между интроном и терминатором через сайты рестрикции NcoI и/или Pac I. Кодоны в целевых генах могут быть оптимизированы с использованием стандартных протоколов для максимальной экспрессии в культурном растении (например, см. Puigbo et al. 2007 и Gasper et al. 2012), а также для удаления нежелательных сайтов рестрикции, при этом они могут быть синтезированы компанией GeneArt (Регенсбург, Германия).

ССЫЛКИ

Esser HO, Dupuis G, Ebert E, Marco GJ, Vogel C (1975) s-Triazines. In: Kearney PC, Kaufman DJ (изд.) *Herbicides, chemistry, degradation and mode of action*. Marcel Dekker, Нью-Йорк, стр. 129–208

Seffernick JL, McTavish H, Osborne JP, de Souza ML, Sadowsky MJ, Wackett LP (2002) Atrazine chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp. strain ADP is a metalloenzyme. *Biochemistry* 41: 14430–14437

Wackett et al.; Biodegradation of atrazine and related s-triazine compounds: from enzymes to field studies, *Applied Microbiology and Biotechnology*; 58 (1), 39-45, 2002

de Souza ML, Sadowsky MJ, Wackett LP (1996) Atrazine chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp strain ADP: Gene sequence, enzyme purification, and protein characterization. *Journal of Bacteriology* 178: 4894–4900.

Sadowski et al.; US 6369299, Transgenic plants expressing bacterial atrazine degrading gene AtzA

Padgett S. R. et al., Site directed mutagenesis of a conserved region of the 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase active-site.; *J.Biol. Chem.*, 266, 33, 1991

Maniatis *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; N.Y. (1982)

Gasper P., Oliveira J-L., Frommlet J., Santos M.A.S., Moura G. (2012) EuGene: maximizing synthetic gene design for heterologous expression. *Bioinformatics* 28(20), 2683-2684.

Murashige and Skoog 1962 *Physiologia* 40 *Plantarum* 15: 473-497, Molecular cloning Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)

Komori T., Imayama T., Kato N., Ishida Y., Ueiki J., Komari T. (2007) Current Status of Binary Vectors and Sub-binary Vectors. *Plant Physiology* 145, 1155-1160.

Puigbo P., Guzman E., Romeu A., Garcia-Valve A. (2007) OPTIMIZER: A Web Server for Optimizing the Codon Usage of DNA Sequences. *Nucleic Acids Research* 35 web server edition. W126-W131.

Siminszky B., Plant cytochrome P450-mediated herbicide metabolism, *Phytochem Rev.* 5:445-458, 2006

Формула изобретения

1. Растение или часть растения, содержащие полинуклеотид, кодирующий полипептид мутированной TrtA, при этом экспрессия указанного полинуклеотида придает растениям или частям растений устойчивость к гербицидам.

2. Растение или часть растения по п. 1, **отличающиеся тем**, что гербицид содержит соединение, являющееся ингибитором биосинтеза целлюлозы.

3. Растение или часть растения по п. 1 или 2, **отличающиеся тем**, что полинуклеотид, кодирующий полипептид мутированной TrtA, содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, или ее гомолог, вариант или производное.

4. Растение или часть растения по любому из пп. 1 или 2, **отличающиеся тем**, что полипептид мутированной TrtA является функциональным вариантом, имеющим по всей длине варианта, по меньшей мере, приблизительно 60%, например, по меньшей мере, приблизительно 80%, 90%, 95%, 98%, 99% или более идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 2.

5. Растение или часть растения по любому из пп. 1 - 4, **отличающиеся тем**, что мутированная TrtA относится к полипептиду TrtA, содержащему последовательность SEQ ID NO: 1, ее ортолог, паралог или гомолог, причем аминокислотная последовательность отличается от аминокислотной последовательности дикого типа в одном или более положениях, соответствующих положениям 92, 93, 155, 157 SEQ ID NO: 2.

6. Семя, способное развиваться в растение, содержащее, по меньшей мере, в некоторых своих клетках полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растения, при этом промотор способен экспрессировать полипептид мутированной TrtA, кодированный указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида мутированной TrtA придает указанному растению устойчивость к гербицидам.

7. Клетка растения или клетка, из которой может быть регенерировано растение, которое, по меньшей мере, в некоторых своих клетках содержит полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растения, при этом промотор способен экспрессировать полипептид мутированной Tg1A, кодированный указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида мутированной Tg1A придает указанному растению устойчивость к гербицидам, при этом указанная клетка растения содержит полинуклеотид, функционально связанный с промотором.

8. Клетка растения, содержащая полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетке, при этом промотор способен экспрессировать полипептид мутированной Tg1A, кодированный указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида мутированной Tg1A придает указанному растению устойчивость к гербицидам.

9. Растительный продукт, полученный из растения или части растения, которые, по меньшей мере, в некоторых своих клетках содержат полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растения, при этом промотор способен экспрессировать полипептид мутированной Tg1A, кодированный указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида мутированной Tg1A придает указанному растению устойчивость к гербицидам.

10. Потомство или потомки растения, которые, по меньшей мере, в некоторых своих клетках содержат полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растения, при этом промотор способен экспрессировать полипептид мутированной Tg1A, кодированный указанным полинуклеотидом, причем указанное потомство или потомки растения, по меньшей мере, в некоторых своих клетках содержат полинуклеотид, функционально связанный с промотором, при этом экспрессия полипептида мутированной Tg1A придает указанному потомству или потомкам растения устойчивость к гербицидам.

11. Способ борьбы с сорняками в месте произрастания растений, при этом указанный способ включает: (a) внесение гербицидной композиции, содержащей гербициды в место произрастания растений; и (b) посев семян в указанном месте, при этом семя способно развиваться в растение, содержащее, по меньшей мере, в

некоторых своих клетках полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растения, при этом промотор способен экспрессировать полипептид мутированной TrtA, кодированный указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида мутированной TrtA придает указанному растению устойчивость к гербицидам.

12. Способ по п. 11, **отличающийся тем**, что гербицидную композицию наносят на сорняки и растение, полученное из указанного семени.

13. Способ по п. 11 или 12, **отличающийся тем**, что гербицид содержит соединение, являющееся ингибитором биосинтеза целлюлозы.

14. Способ получения растения с устойчивостью к гербицидам, при этом указанный способ включает регенерирование растения из клетки растения, трансформированной с использованием рекомбинантного полинуклеотида, функционально связанного с промотором, функционирующим в клетке, при этом промотор способен экспрессировать полипептид мутированной TrtA, кодированный указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида мутированной TrtA придает указанному растению устойчивость к гербицидам.

15. Способ получения потомства растения с устойчивостью к гербицидам, при этом указанный способ включает: скрещивание первого растения, обладающего устойчивостью к гербицидам, со вторым растением для получения потомства растения, обладающего устойчивостью к гербицидам, причем первое растение и потомство растения, по меньшей мере, в некоторых своих клетках содержат полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растения, при этом промотор способен экспрессировать полипептид мутированной TrtA, кодированный указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида мутированной TrtA придает указанному растению устойчивость к гербицидам.

16. Растение или часть растения, которые, по меньшей мере, в некоторых своих клетках содержат полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растения, при этом промотор способен экспрессировать полипептид с мутированной TrtA, кодированный указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида TrtA с мутированной TrtA

придает указанному растению устойчивость к гербицидам, при этом растение или часть растения дополнительно проявляют характеристику устойчивости ко второму или третьему гербициду.

17. Изолированная и/или полученная рекомбинантным путем и/или синтетическая молекула нуклеиновой кислоты, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид с мутированной TrtA, выбранную из группы, состоящей из:

- (a) молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид с мутированной TrtA и содержащей последовательность SEQ ID NO: 2 или ее вариант, паралог, ортолог или гомолог;
- (b) молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность SEQ ID NO: 1 или ее вариант, паралог, ортолог или гомолог;
- (c) молекулы нуклеиновой кислоты, которая, в результате дегенерации генетического кода может быть получена из последовательности полипептида TrtA SEQ ID NO: 2 или ее варианта, паралога, ортолога или гомолога, и придает повышенную устойчивость или стойкость к гербицидам по сравнению с соответствующей, например, нетрансформированной, клеткой растения дикого типа, растением или его частью;
- (d) молекулы нуклеиновой кислоты с идентичностью 30% или более, предпочтительно 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более с последовательностью молекулы нуклеиновой кислоты полинуклеотида, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или ее варианта, паралога, ортолога или гомолога, и придает повышенную устойчивость или стойкость к гербицидам по сравнению с соответствующей, например, нетрансформированной, клеткой растения дикого типа, растением или его частью;
- (e) молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид с мутированной TrtA, с идентичностью 30% или более, предпочтительно, по меньшей мере, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более с

аминокислотной последовательностью полипептида TrtA последовательности SEQ ID NO: 2 и придает повышенную устойчивость или стойкость к гербицидам по сравнению с соответствующей, например, нетрансформированной, клеткой растения дикого типа, растением или его частью;

- (f) молекулы нуклеиновой кислоты, которая гибридизирует с молекулой нуклеиновой кислоты по пунктам (a), (b), (c), (d) или (e) в жестких условиях гибридизации и придает повышенную устойчивость или стойкость к гербицидам по сравнению с соответствующей, например, нетрансформированной, клеткой растения дикого типа, растением или его частью;

причем аминокислотная последовательность полипептида с мутированной TrtA отличается от аминокислотной последовательности дикого типа полипептида TrtA в одном или более положениях, соответствующих следующим положениям SEQ ID NO: 2: 92, 93, 155, 157.

18. Кассета экспрессии, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 17, а также промотор, функционирующий в клетках растения.

19. Кассета экспрессии по п. 18, **отличающаяся тем**, что промотор является специфическим для корня промотором.

20. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 17 или кассету экспрессии по п. 18 или 19.

21. Полипептид с изолированной, рекомбинантной и/или химически синтезированной мутированной TrtA, кодированный молекулой нуклеиновой кислоты по п. 17, или полипептид, обладающий, по меньшей мере, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 2, или ее вариантом, паралогом, ортологом или гомологом, причем аминокислотная последовательность полипептида с мутированной TrtA отличается от аминокислотной последовательности дикого типа полипептида TrtA в одном или более положениях, соответствующих следующим положениям SEQ ID NO: 2: 92, 93, 155, 157.

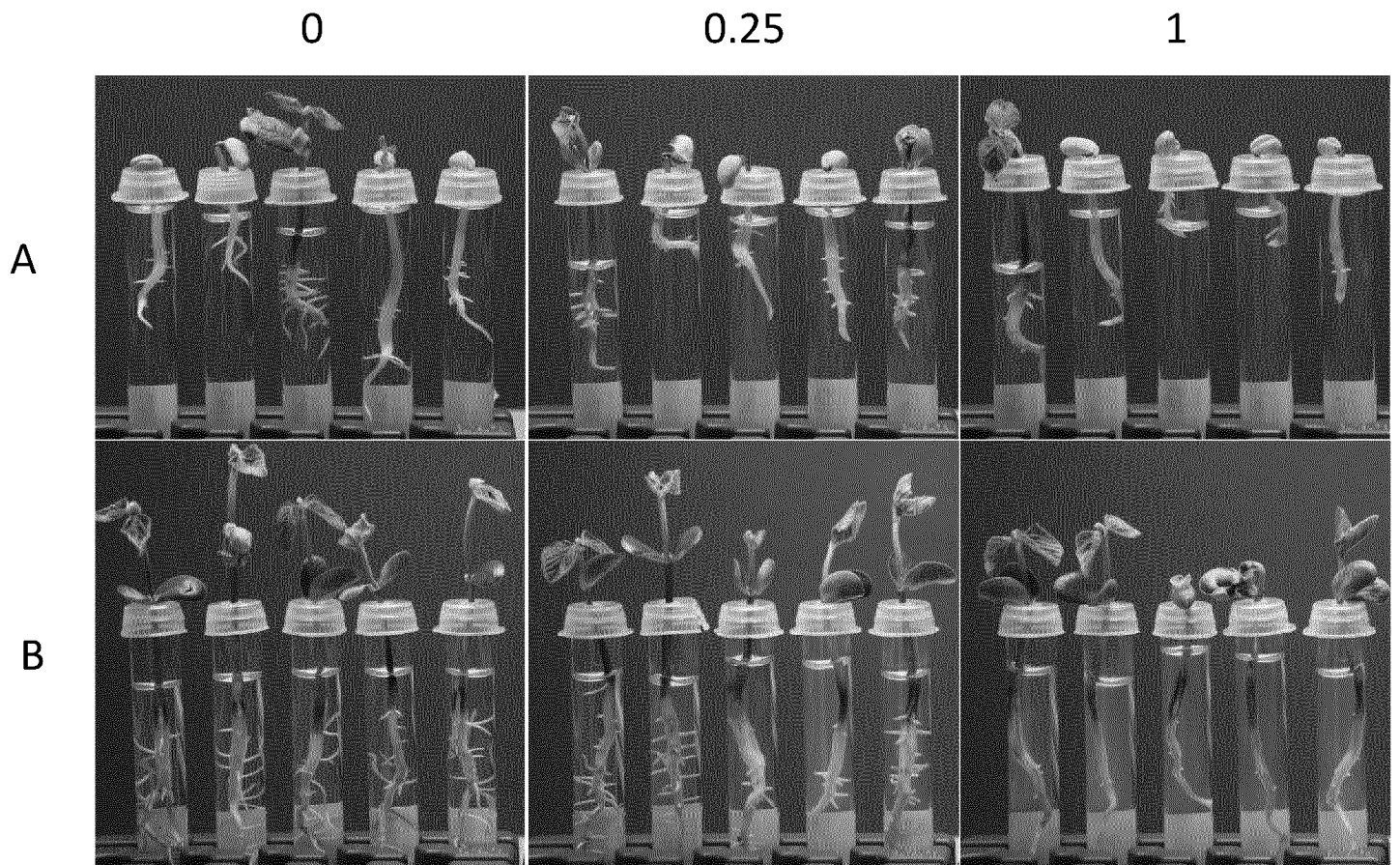
22. Способ получения растительного продукта из растения по п. 1, при этом указанный способ включает переработку растения или части растения для получения растительного продукта.

23. Способ по п. 22, **отличающийся тем**, что растительным продуктом является фураж, жмыховая мука, масло или дражированные в процессе обработки семена.

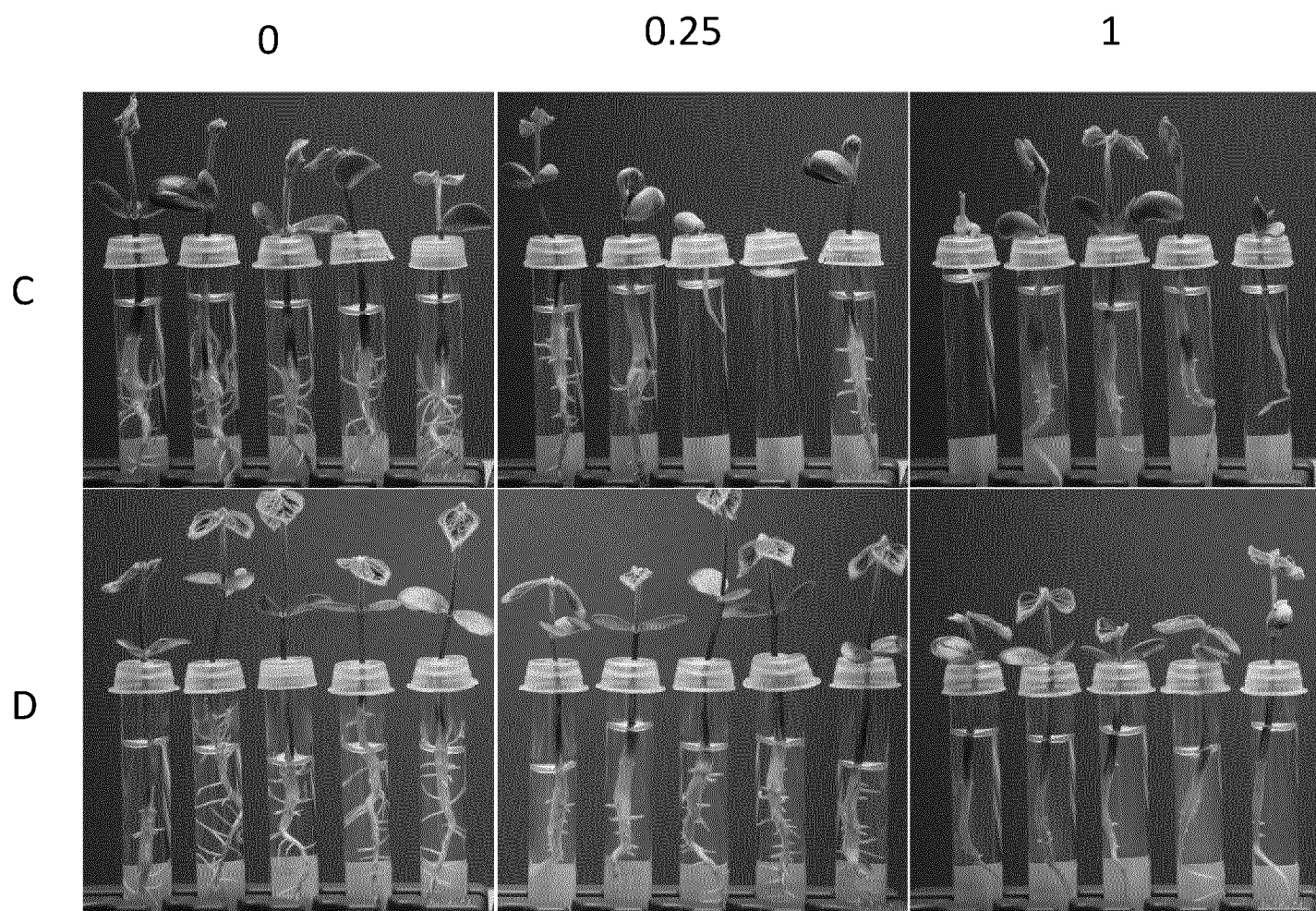
24. Растительный продукт, полученный из растения или части растения, причем растение или часть растения содержат, по меньшей мере, в некоторых своих клетках полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растения, при этом промотор способен экспрессировать полипептид мутированной Tg1A, кодированный указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида мутированной Tg1A придает указанному растению устойчивость к гербицидам, при этом растение или часть растения дополнительно проявляют характеристику устойчивости ко второму или третьему гербициду.

25. Растительный продукт по п. 24, **отличающийся тем**, что продуктом является фураж, жмыховая мука, масло или дражированные в процессе обработки семена.

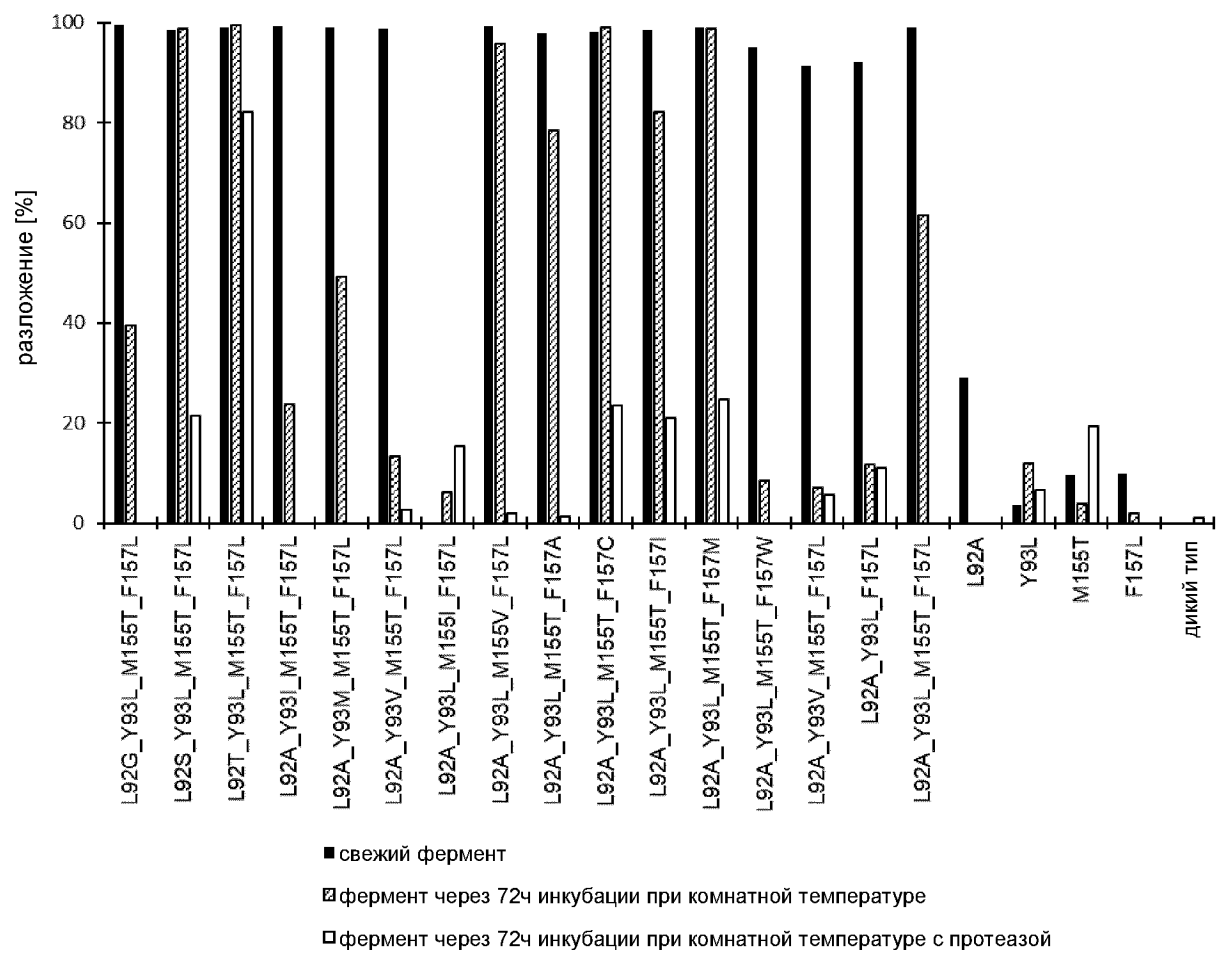
ФИГУРА 1 из 3 А, В



ФИГУРА 1 С, D



ФИГУРА 2 из 3



ФИГУРА 3 из 3

