

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037938**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.06.09

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

(21) Номер заявки
201590367

(22) Дата подачи заявки
2013.09.13

(54) ВАРИАНТЫ HPPD И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **61/701,037; 61/766,057; 61/790,404**

(56) EP-A1-2453012
WO-A1-2009144079
WO-A1-2011053557

(32) **2012.09.14; 2013.02.18; 2013.03.15**

(33) **US**

(43) **2015.12.30**

(86) **PCT/US2013/059598**

(87) **WO 2014/043435 2014.03.20**

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

(72) Изобретатель:
**Поре Фабиен, Хайнрикс Фолькер,
Ланге Гудрун, Лабер Бернд (DE),
Питерс Шерил, Шутен Лаура (US)**

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

(57) В соответствии с изобретением предложены композиции и способы придания бактериям, растениям, клеткам растений, тканям и семенам устойчивости к гербицидам. Композиции содержат полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, которые придают устойчивость к гербицидам, векторы, содержащие указанные полинуклеотиды, и клетки-хозяева, содержащие указанные векторы. Нуклеотидные последовательности согласно настоящему изобретению можно применять в конструкциях ДНК или кассетах экспрессии для трансформации и экспрессии в организмах, включая микроорганизмы и растения. Композиции также содержат трансформированные бактерии, растения, клетки, ткани и семена растений. В частности, в соответствии с настоящим изобретением предложены выделенные полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, придающие устойчивость к ингибиторам HPPD. Помимо этого в соответствии с настоящим изобретением предложены аминокислотные последовательности, соответствующие указанным полинуклеотидам.

B1**037938****037938****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки на патент

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 61/701037, поданной 14 сентября 2012 г.; № 61/766057, поданной 18 февраля 2013 г.; и № 61/790404, поданной 15 марта 2013 г., содержание которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылок.

Ссылка на перечень последовательностей, поданный в электронной форме

Данная официальная копия указанного перечня последовательностей подана в электронной форме с помощью системы EFS-Web как перечень последовательностей в формате ASCII, названный "2912939_19973WO 01_SEQLIST.txt" и созданный 12 сентября 2013 г., размер данного файла составляет 237 килобайт, и указанный файл подан совместно с настоящей заявкой. Перечень последовательностей, содержащийся в указанном документе в формате ASCII, является частью настоящего описания и полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к молекулярной биологии растений, в частности к новым полипептидам гидроксифенилпируват диоксигеназы (HPPD), которые придают повышенную устойчивость к гербицидам-ингибиторам HPPD.

Уровень техники

4-Гидроксифенилпируват диоксигеназы (HPPD) представляют собой ферменты, катализирующие реакции, в которых пара-гидроксифенилпируват (сокращенно обозначенный в настоящей заявке как HPP), продукт расщепления тирозина, превращается в гомогентисат (сокращенно обозначенный в настоящей заявке как HG), предшественник токоферола и пластохинона в растениях (Crouch N.P. et al. (1997), Tetrahedron, 53, 20, 6993-7010, Fritze et al. (2004), Plant Physiology 134: 1388-1400). Токоферол действует как связанный с мембраной антиоксидант. Пластохинон, во-первых, действует в качестве переносчика электронов между ФСП и цитохромным комплексом B6/f, и, во-вторых, является окислительно-восстановительным кофактором для фитоендецатуразы, которая участвует в биосинтезе каротиноидов.

На данный момент более 1000 последовательностей присутствующих в базе данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI) нуклеиновых кислот из различных организмов, были аннотированы как кодирующие белок, предположительно содержащий домен HPPD. Однако в отношении большинства из этих последовательностей не было доказано, что указанный белок мог бы иметь ферментативную активность HPPD как в исследованиях в условиях *in vitro*, так и при использовании подхода *in planta*, а также то, что такой белок HPPD может придать устойчивость к гербицидам-ингибиторам HPPD при экспрессии в растении. Несколько белков HPPD и их первичные последовательности были описаны в данной области техники, в частности белки HPPD из бактерий, таких как *Pseudomonas* (Rüetschi et al., Eur. J. Biochem., 205, 459-466, 1992, WO 96/38567), *Kordia* (WO 2011076889), *Synechococcus* (WO 2011076877) и *Rhodococcus* (WO 2011076892), протестов, таких как *Blepharisma* (WO 2011076882), эуриархеот, таких как *Picrophilus* (WO 2011076885), растений, таких как *Arabidopsis* (WO 96/38567, GENBANK® AF047834), морковь (WO 96/38567, GENBANK® 87257), *Avena sativa* (WO 02/046387, WO 11/068567), пшеница (WO 02/046387), *Brachiaria platyphylla* (WO 02/046387), *Cenchrus echinatus* (WO 02/046387), *Lolium rigidum* (WO 02/046387), *Festuca arundinacea* (WO 02/046387), *Setaria faberi* (WO 02/046387), *Eleusine indica* (WO 02/046387), *сopro* (WO 02/046387, WO 12/021785), кукуруза (WO 12/021785), *Coccicoides* (GENBANK® COITRP), *Coptis japonica* (WO 06/132270), *Chlamydomonas reinhardtii* (ES 2275365)/WO 2011/145015, или млекопитающих, таких как мышь или свинья.

Ингибирование HPPD ведет к прерыванию процесса фотосинтеза, нехватке дополнительных свето-собирающих пигментов и, самое главное, к разрушению хлорофилла под действием УФ-излучения и активных форм кислорода (обесцвечивание) из-за отсутствия фотозащиты, которую обычно обеспечивают каротиноиды (Norris et al. (1995), Plant Cell 7: 2139-2149). Обесцвечивание фотосинтетически активных тканей приводит к ингибированию роста и гибели растений.

Было доказано, что некоторые молекулы, которые ингибируют HPPD и ингибируют превращение HPP в гомогентисат, при специфичном связывании с ферментом, являются очень эффективными гербицидами.

В настоящее время большинство коммерчески доступных гербицидов, представляющих собой ингибиторы HPPD, относятся к одному из следующих семейств химических соединений:

- 1) трикетоны, например салкотрион [т.е. 2-[2-хлор-4-(метилсульфонил)бензоил]-1,3-циклогександион], мезотрион [т.е. 2-[4-(метилсульфонил)-2-нитробензоил]-1,3-циклогександион]; темботрион [т.е. 2-[2-хлор-4-(метилсульфонил)-3-[(2,2,2-трифторэтокси)метил]бензоил]-1,3-циклогександион]; тефурилтрион [т.е. 2-[2-хлор-4-(метилсульфонил)-3-[[тетрагидро-2-фурил)метокси]метил]бензоил]-1,3-циклогександион]; бициклопирон [т.е. 4-гидрокси-3-[[2-[(2-метоксиэтокси)метил]-6-(трифторметил)-3-пиридинил]карбонил]бикцикло[3.2.1]окт-3-ен-2-он]; бензобициклон [т.е. 3-(2-хлор-4-метилбензоил)-2-фенилтиобикцикло[3.2.1]окт-2-ен-4-он];
- 2) дикетонитрилы, например 2-циано-3-циклопропил-1-(2-метилсульфонил-4-трифторметилфенил)-

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

3) изоксазолы, например, изоксафлутол [т.е. (5-циклопропил-4-изоксазолил)[2-(метилсульфонил)-4-(трифторметил)фенил]метанон]. В растениях изоксафлутол быстро метаболизируется с образованием DKN, дикетонитрильного соединения, которое обладает свойством ингибитора HPPD;

4) пиразолинаты, например, топрамезон [т.е. [3-(4,5-дигидро-3-изоксазолил)-2-метил-4-(метилсульфонил)фенил](5-гидрокси-1-метил-1H-пиразол-4-ил)метанон] и пирасульфотол [т.е. (5-гидрокси-1,3-диметилпиразол-4-ил)(2-метил-4-трифторметилфенил)метанон]; пиразофен [т.е. 2[4-(2,4-дихлорбензоил)-1,3-диметилпиразол-5-илокси]ацетофенон];

5) N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамиды (WO 2011/035874) и

6) N-(тетразол-4-ил)- или N-(триазол-3-ил)арилкарбоксамиды (WO 2012/028579).

Такие гербициды, ингибирующие HPPD, можно применять против трав и/или широколиственных сорных растений на полях сельскохозяйственных культур, которые проявляют метаболическую устойчивость, таких как кукуруза (*Zea mays*), рис (*Oryza sativa*) и пшеница (*Triticum aestivum*), в которых указанные гербициды быстро расщепляются (Schulz et al. (1993), FEBS letters, 318, 162-166; Mitchell et al. (2001), Pest Management Science, Vol. 57, 120-128; Garcia et al. (2000), Biochem., 39, 7501-7507; Pallett et al. (2001), Pest Management Science, Vol. 57, 133-142). Для того чтобы расширить область применения указанных гербицидов, ингибирующих HPPD, были предприняты определенные усилия по приданию растениям, в частности растениям, которые лишены или имеют неэффективную метаболическую устойчивость, уровня устойчивости, приемлемого в агротехнических полевых условиях.

Помимо попытки обойти HPPD-опосредованную выработку гомогентисата (US 6812010), была осуществлена сверхэкспрессия чувствительного фермента, с тем, чтобы получить в растении некоторое количество фермента-мишени, которое является достаточным по отношению к уровню гербицида. (WO 96/38567). Сверхэкспрессия HPPD привела к улучшению долевых устойчивости к производному дикетонитрила (DKN), изоксафлутолу (IFT), однако уровень устойчивости был недостаточным для придания устойчивости к послевсходовой обработке (Matringe et al. (2005), Pest Management Science 61:269-276).

Третья стратегия заключалась во введении мутации в HPPD для получения фермента-мишени, который является менее чувствительным к ингибиторам HPPD, по сравнению с нативным HPPD до осуществления мутации, и при этом сохраняет свою способность катализировать превращение HPP в гомогентисат.

Эта стратегия была успешно использована для получения растений, устойчивых к 2-циано-3-циклопропил-1-(2-метилсульфонил-4-трифторметилфенил)пропан-1,3-диону и 2-циано-1-[4-(метилсульфонил)-2-трифторметилфенил]-3-(1-метилциклопропил)пропан-1,3-диону (EP 496630), двум HPPD-ингибирующим гербицидам, принадлежащим к семейству дикетонитрилов (WO 99/24585). Мутации Pro215Leu, Gly336Glu, Gly336Ile и более конкретно Gly336Trp (положения мутантных аминокислот указаны со ссылкой на HPPD из *Pseudomonas*) были идентифицированы как мутации, которые ответственны за увеличенную устойчивость к обработке этими дикетонитрильными гербицидами. Позднее было показано, что введение гена HPPD из *Pseudomonas* в геном пластид табака и сои является более эффективным, чем трансформация ядра, придающая устойчивость к послевсходовому применению изоксафлутола (Dufourmantel et al. (2007), Plant Biotechnol J.5(1): 118-33).

В WO 04/024928 авторы предприняли попытку увеличить биосинтез пренилхинона (например, синтез пластохинонов, токоферолов) в клетках растений путем увеличения потока предшественника HPP в клетки этих растений. Эта задача была осуществлена путем соединения синтеза указанного предшественника с шикиматным метаболическим путем с помощью гиперэкспрессии фермента PDH. Авторы также отметили, что трансформация растений геном, кодирующим фермент PDH, и геном, кодирующим фермент HPPD, позволяет увеличить устойчивость указанных растений к ингибиторам HPPD.

В заявке на патент WO 2009/144079 раскрыты последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие гидроксибензилпируват диоксигеназу (HPPD), содержащие специфические мутации в положении 336 белка HPPD из *Pseudomonas fluorescens*, и их применение для получения растений, которые устойчивы к гербицидам-ингибиторам HPPD. В WO 2002/046387 идентифицированы несколько доменов белков HPPD, полученных из растений, которые могут быть пригодны для придания устойчивости к различным гербицидам-ингибиторам HPPD, однако авторы не представили данные, полученные в условиях *in planta*, или биохимические данные, подтверждающие влияние функций описанных доменов.

В WO 2008/150473 была предложена комбинация двух различных механизмов устойчивости, включающая модифицированный ген *Avena saliva*, кодирующий мутантный фермент HPPD, и ген монооксигеназы CYP450 кукурузы (ген *nsfl*), для получения улучшенной устойчивости к гербицидам-ингибиторам HPPD, однако не были раскрыты данные, демонстрирующие синергетическое действие, основанное на комбинации обоих белков.

В заявке на патент США US 20110173718 также раскрыт способ получения растений, устойчивых к ингибиторам HPPD, путем гиперэкспрессии не только гена, кодирующего устойчивый фермент HPPD, такого как, например, ген из *Avena saliva*, но также его комбинации с несколькими генами растений, ко-

дирующими белок HST (гомогентисат солансилтрансферазу). Тем не менее, уровень устойчивости к некоторым выбранным гербицидам-ингибиторам HPPD был довольно ограничен.

В WO 2011094199 и US 20110185444 проведена оценка устойчивости нескольких сотен линий сои дикого типа к действию изоксафлутола, ингибитора HPPD. Очень немногие линии проявляли достаточный уровень устойчивости к гербицидам. Были выявлены предполагаемые ЛКП (локусы количественных признаков), отвечающие за устойчивость. В этой области генома ген, кодирующий ABC транспортер, был выявлен как главный признак, который ответственен за наблюдаемую увеличенную устойчивость к гербицидам-ингибиторам HPPD. Тем не менее, трансгенные растения, экспрессирующие выявленные гены, не проявляли какого-либо увеличения устойчивости к исследуемым гербицидам-ингибиторам HPPD.

В WO 2010/085705 раскрыты несколько мутантов HPPD из *Avena saliva*. Было показано, что некоторые из вариантов проявляли улучшенную устойчивость в условиях *in vitro* к трикетону "мезотриону", однако лишь очень немногие мутанты были экспрессированы в растениях табака. Помимо этого ни одно из растений табака, экспрессирующих указанные мутанты, не проявляло улучшенной устойчивости к мезотриону или изоксафлутолу по сравнению с растениями табака, экспрессирующими ген HPPD дикого типа из *Avena saliva*.

В US 2012/0042413 описаны полипептиды, обладающие активностью HPPD, которые также проявляют определенную нечувствительность по меньшей мере к одному ингибитору HPPD, и дополнительно предложен определенный набор мутаций в различных положениях ферментов HPPD и, наконец, раскрыты биохимические данные, а также уровни устойчивости растений, содержащих несколько из таких мутантных HPPD.

В EP 21453012 раскрыты несколько мутантов HPPD; однако улучшенная устойчивость описанных мутантов не была продемонстрирована в условиях *in planta* в отношении нескольких гербицидов-ингибиторов HPPD.

Краткое описание изобретения

В соответствии с настоящим изобретением предложены композиции и способы придания устойчивости к гербицидам, представляющим собой ингибиторы HPPD. Композиции содержат полипептиды HPPD, которые устойчивы к гербицидам-ингибиторам HPPD, и выделенные, рекомбинантные или химические молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие такие полипептиды, векторы и клетки-хозяева, содержащие такие молекулы нуклеиновых кислот. Композиции также содержат антитела к указанным полипептидам. Нуклеотидные последовательности можно применять в конструкциях ДНК или кассетах экспрессии для трансформации и экспрессии в организмах, включая микроорганизмы и растения. Нуклеотидные последовательности могут представлять собой синтетические последовательности, которые были сконструированы для экспрессии в организме, включая, но не ограничиваясь ими, микроорганизм или растение.

Композиции содержат молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие полипептиды, устойчивые к гербицидам, включая молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие белок HPPD, содержащий одну или более замен аминокислоты в положениях, соответствующих положениям аминокислот 188, 189, 215, 335, 336, 339 и 340 в последовательности SEQ ID NO: 1, включая белок HPPD, приведенный в любой из последовательностей SEQ ID NO: 1, 2, 63, 64 или 65, при этом были введены одна или более замен аминокислоты в положения, соответствующие положениям аминокислот 188, 189, 215, 335, 336, 339 и 340 в последовательности SEQ ID NO: 1, и включая любую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотные последовательности, приведенные в любой из последовательностей SEQ ID NO: 3-59, а также их варианты и фрагменты. Настоящее изобретение также включает белок HPPD, устойчивый к гербицидам, который кодируют указанные молекулы нуклеиновых кислот, а также композиции, содержащие указанный белок HPPD.

Композиции также содержат трансформированные бактерии, растения, клетки растения, ткани и семена, которые устойчивы к гербицидам-ингибиторам HPPD за счет введения последовательности нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению в геном указанных бактерий, растений, клеток растений, тканей и семян. В том случае, если организм представляет собой растение, введение последовательности позволяет применять гербициды-ингибиторы HPPD для обработки растений, чтобы селективно вызывать гибель сорных растений, чувствительных к ингибиторам HPPD, или других нетрансформированных растений, но не трансформированного организма. Последовательности можно дополнительно применять в качестве маркера для отбора клеток растения, способных расти в присутствии одного или более гербицидов-ингибиторов HPPD.

В соответствии с настоящим изобретением также предложены способы выявления фермента HPPD, активность которого устойчива к действию ингибитора HPPD. Композиции и способы согласно настоящему изобретению подходят для получения организмов с увеличенной устойчивостью к гербицидам-ингибиторам HPPD. Такие организмы и композиции, содержащие указанные организмы, являются желательными для сельскохозяйственных целей. Растения или семена, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, можно выращивать в полевых условиях и собирать для получения растительного продукта. Композиции согласно настоящему изобретению также под-

ходят для получения измененных или улучшенных белков, которые обладают активностью, обеспечивающей устойчивость к действию гербицидов-ингибиторов HPPD, или для детектирования наличия белков или нуклеиновых кислот, устойчивых к гербицидам-ингибиторам HPPD, в продуктах или организмах.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано выравнивание аминокислотной последовательности ферментов HPPD из некоторых видов микроорганизмов и растений, включая *Pseudomonas fluorescens* (SEQ ID NO: 1), *Avena sativa* (SEQ ID NO: 63), вариант HPPD из *Avena sativa* (SEQ ID NO: 64), *Zea mays* (SEQ ID NO: 65), *Streptomyces avermitilis* (SEQ ID NO: 69), *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 66), *Hordeum vulgare* (SEQ ID NO: 67), *Daucus carota* (SEQ ID NO: 68), *Mycosphaerella graminicola* (SEQ ID NO: 70) и *Coccidioides immitis* (SEQ ID NO: 71).

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение далее будет более подробно описано со ссылкой на прилагаемые чертежи, на которых показаны некоторые, но не все, варианты реализации изобретения. Действительно, указанные варианты изобретения могут быть реализованы во многих различных формах и не должны быть истолкованы как ограниченные вариантами реализации, приведенными в настоящей заявке; предпочтительно, данные варианты реализации предложены, чтобы настоящее изобретение удовлетворяло требованиям действующего законодательства. Одинаковые номера относятся к одинаковым элементам по всему описанию.

Многие модификации и другие варианты реализации раскрытого в данном описании изобретения будут очевидны для специалиста в данной области техники, к которой относятся данные варианты изобретения, после ознакомления с настоящим описанием и сопутствующими чертежами. Таким образом, следует понимать, что варианты реализации изобретения не должны быть ограничены конкретными вариантами реализации, раскрытыми в настоящей заявке, и что модификации и другие варианты реализации предназначены для включения в объем прилагаемой формулы изобретения. Несмотря на то, что в настоящей заявке используются специфичные термины, они используются исключительно в общем и описательном смысле, а не с целью ограничения.

Общие сведения

Было предпринято несколько попыток придать растениям агротехнически приемлемый уровень устойчивости к широкому спектру гербицидов-ингибиторов HPPD, включая попытку обойти HPPD-опосредованную выработку гомогентисата (homogentisate, US 6812010), гиперэкспрессию чувствительного фермента, так, чтобы получить некоторые количества фермента-мишени в растении, которые достаточны по отношению к уровню гербицида (WO 96/38567), и введение мутаций в HPPD для получения фермента-мишени, который является менее чувствительным к ингибиторам HPPD, чем нативный HPPD до введения мутации, и при этом сохраняет свои свойства катализировать превращение HPP в гомогентисат.

Несмотря на эти успехи, достигнутые в разработке растений, проявляющих устойчивость к нескольким гербицидам-ингибиторам HPPD, описанным выше, по-прежнему существует необходимость в разработке и/или улучшении устойчивости растений к более новым или нескольким различным ингибиторам HPPD, в частности, ингибиторам HPPD, принадлежащим к классам трикетонов (например, салкотриону, мезотриону, темботриону, бензобиклолону и бициклопирону), пиразолинатов (например, топрамезону и пирасульфотолу), N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамидов (WO 2011/035874) и N-(тетразол-4-ил)-или N-(триазол-3-ил)арилкарбоксаминов (WO 2012/028579).

Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением предложены улучшенные композиции и способы для регулирования устойчивости к гербицидам-ингибиторам HPPD. Гербициды-ингибиторы HPPD, такие как ингибиторы, относящиеся к классу N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамидов, N-(тетразол-4-ил)-или N-(триазол-3-ил)арилкарбоксаминов, такие как 2-хлор-3-этокси-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)бензамид и 2-хлор-3-(метоксиметил)-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)бензамид, к классу трикетонов, такие как темботрион, салкотрион и мезотрион, к классу изоксазолов, такие как изоксафлутол, или к классу пиразолинатов, такие как пирасульфотол и топрамезон, в частности, выбранные из темботриона, салкотриона, топрамезона, бициклопирона, тефурилтриона, изоксафлутола и мезотриона, имеют превосходную гербицидную активность против широкого спектра экономически важных однодольных и двудольных однолетних сорных растений. Активные вещества также эффективно действуют на многолетние сорные растения, которые продуцируют побеги из корневищ, остатков древесины или других многолетних органов, и с которыми трудно бороться. Применительно к настоящему изобретению термин "гербицид" подразумевает вещество с гербицидной активностью само по себе или такое вещество, которое комбинируют с добавкой, которая изменяет его эффективность, такой как, например, агент, который увеличивает его активность (синергический агент) или который ограничивает его активность (антидот). Гербицид может дополнительно содержать твердые или жидкие адъюванты или носители, которые обычно используются в технологии изготовления препаративных форм (например, природные или восстановленные минеральные вещества, растворители, диспергирующие агенты, смачивающие агенты, склеивающие агенты, эмульгаторы, стимулирующие рост агенты и т.п.), а

также один или более дополнительных гербицидов и/или один или более пестицидов (например, инсектициды, вируциды, микробициды, амебоциды, пестициды, фунгициды, бактерициды, нематоциды, моллюскициды и т.п.).

Способы включают осуществление трансформации организмов нуклеотидными последовательностями, кодирующими ген устойчивости к ингибитору HPPD согласно настоящему изобретению, или введение иными способами таких генов устойчивости к ингибитору HPPD в организмы, не содержащие эти гены (например, путем спаривания, слияния клеток или путем скрещивания организмов, содержащих введенный ген устойчивости к ингибитору HPPD согласно настоящему изобретению, с организмами, не содержащими такой ген, и получения потомства, содержащего данный ген). Нуклеотидные последовательности согласно настоящему изобретению подходят для получения растений, которые обладают увеличенной устойчивостью к гербицидам-ингибиторам HPPD, в частности увеличенной устойчивостью к гербицидам-ингибиторам HPPD, относящимся к классу N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамидов, N-(тетразол-4-ил)-или N-(триазол-3-ил)арилкарбоксамидов, таким как 2-хлор-3-этокси-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)бензамид и 2-хлор-3-(метоксиметил)-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)бензамид, к классу трикетонов, таким как темботрион и салкотрион и мезотрион, к классу изоксазолов, таким как изоксафлутол, или к классу пиразолинов, таким как пирасульфотол и топрамезон, в частности, выбранным из темботриона, салкотриона, топрамезона, бициклопирона, тефурилтриона, изоксафлутола и мезотриона. Ген устойчивости к гербицидам-ингибиторам HPPD согласно настоящему изобретению может также проявлять устойчивость по отношению к "гербицидам-производным кумарона" (описанным в WO 2009/090401, WO 2009/090402, WO 2008/071918, WO 2008/009908). В этой связи, любой из генов устойчивости к гербицидам-ингибиторам HPPD согласно настоящему изобретению также может быть экспрессирован в растении, также экспрессирующем химерный ген гомогентисат солансилтрансферазы (HST) или мутантный ген HST, описанные в WO 2011/145015, WO 2013/064987, WO 2013/064964 или WO 2010/029311, чтобы получить растения, устойчивые к гербицидам-ингибиторам HST. В настоящей заявке термины "гербицид-производное кумарона" или "гербицид-ингибитор HST" включают соединения, которые обозначаются в соответствии с номенклатурой IUPAC как 5H-тиопирано[4,3-b]пиридин-8-ол, 5H-тиопирано[3,4-b]пиразин-8-ол, оксатиино[5,6-b]пиридин-4-ол и оксатиино[5,6-b]пиразин-4-ол. Следовательно, под термином ген "устойчивости к гербицидам-ингибиторам HPPD" согласно настоящему изобретению подразумевают ген, кодирующий белок, который придает клетке или организму способность переносить более высокие концентрации гербицида-ингибитора HPPD, по сравнению с такой клеткой или организмом, которые не экспрессируют белок, или переносить определенную концентрацию гербицида-ингибитора HPPD в течение более длительного периода времени, по сравнению с такой клеткой или организмом, который не экспрессирует указанный белок, либо ген, который придает клетке или организму способность осуществлять фотосинтез, расти и/или воспроизводиться с меньшей степенью наблюдаемого повреждения или ингибирования роста, по сравнению с такой клеткой или организмом, которые не экспрессируют указанный белок. Термин "белок, придающий устойчивость к ингибитору HPPD" включает белок, который придает клетке или организму способность переносить более высокую концентрацию гербицида-ингибитора HPPD, по сравнению с такой клеткой или организмом, которые не экспрессируют указанный белок, или переносить определенную концентрацию гербицида-ингибитора HPPD в течение более длительного периода времени, по сравнению с такой клеткой или организмом, которые не экспрессируют указанный белок, либо белок, который придает клетке или организму способность осуществлять фотосинтез, расти и/или воспроизводиться с меньшей степенью наблюдаемого повреждения или ингибирования роста, по сравнению с такой клеткой или организмом, которые не экспрессируют указанный белок. Термины "переносить" или "устойчивость" подразумевают выживание при применении конкретного гербицида-ингибитора HPPD или способность осуществлять жизненно важные клеточные функции, такие как фотосинтез, синтез белка или дыхание и размножение, способом, который явно не отличим от такового в необработанных клетках или организмах, или способность не иметь какого-либо существенного отличия урожайности или даже увеличения урожайности для растений, обработанных гербицидом-ингибитором HPPD, по сравнению с растениями этого же вида, не обработанными таким гербицидом (в тех случаях, когда сорные растения были удалены или их рост был предотвращен с помощью механизма, отличного от применения гербицида-ингибитора HPPD, например, способы, описанные в международной заявке на патент WO 2011/100302, которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки).

Помимо придания клетке устойчивости к ингибитору HPPD, последовательности нуклеиновых кислот HPPD согласно настоящему изобретению кодируют полипептиды, имеющие активность HPPD, т.е., катализирующие реакцию, в которой пара-гидроксифенилпириват (PHPP) превращается в гомогентисат. Предпочтительно, каталитическая активность белка HPPD согласно настоящему изобретению, при исследовании в условиях *in vitro*, не отличается от активности стандартного белка HPPD более чем на 90%, более чем на 70%, или более чем 50%, при количественной оценке в идентичных условиях и в отсутствие гербицидов-ингибиторов HPPD, описанных выше. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения каталитическая активность улучшена по сравнению с активностью стандартного белка HPPD. Каталитическая активность фермента HPPD может быть определена различными способами, хо-

рошо известными в данной области техники. В WO 2009/144079 описаны различные подходящие способы скрининга.

Ферменты HPPD, которые проявляют увеличенную устойчивость к гербициду-ингибитору HPPD, могут осуществлять это, проявляя, по отношению к стандартному HPPD: а) более высокое значение K_m в отношении природного субстрата, 4-гидроксифенилпирувата; б) более низкое значение k_{cat} для реакции превращения 4-гидроксифенилпирувата в гомогентисат; с) более низкое значение константы скорости прямой реакции, k_{on} , регулирующей образование комплекса фермент:гербицид-ингибитор HPPD; d) увеличенное значение константы скорости обратной реакции, k_{off} , регулирующей диссоциацию комплекса фермент:гербицид-ингибитор HPPD; и/или е) в результате изменений в одном или обоих пунктах с) и d), увеличенное значение равновесной константы, K_i (также называемой K_d), регулирующей диссоциацию комплекса фермент:гербицид-ингибитор HPPD.

Ферментативную активность белков HPPD можно измерить с помощью любого способа, который позволяет оценить уменьшение количества субстратов HPP или O_2 , или оценить накопление любого из продуктов, полученных в ходе ферментативной реакции, т.е. гомогентисата или CO_2 . В частности, активность HPPD можно измерить с помощью способа, описанного в WO 2009/144079; Garcia et al. (1997), Biochem. J. 325, 761-769; Garcia et al. (1999), Plant Physiol. 119, 1507-1516; или в WO 2012/021785, которые включены в настоящую заявку посредством ссылки.

Применительно к целям настоящего изобретения термин "стандартный" белок HPPD (или ген HPPD) представляет собой любой белок HPPD или нуклеиновую кислоту HPPD, с которыми сравнивают белок HPPD или нуклеиновую кислоту HPPD согласно настоящему изобретению. Такой стандартный HPPD может представлять собой природный HPPD растительного, бактериального или животного происхождения, или может представлять собой мутантный HPPD, который известен в данной области техники. Такой стандартный HPPD можно использовать для определения наличия у белка HPPD или нуклеиновой кислоты HPPD согласно настоящему изобретению конкретного свойства, представляющего интерес (например, улучшенной, сопоставимой или уменьшенной устойчивости к гербициду-ингибитору HPPD или активности фермента HPPD; улучшенной, сопоставимой или сниженной экспрессии в клетке-хозяине; улучшенной, сопоставимой или уменьшенной стабильности белка и т.п.).

Согласно различным вариантам реализации, раскрытым в настоящей заявке, нуклеиновая кислота, придающая устойчивость к гербицидам-ингибиторам HPPD (включая ее выделенные, рекомбинантные и химерные гены, векторы, клетки-хозяева, растения, части растений и семена, содержащие указанную нуклеиновую кислоту, полипептиды HPPD и их композиции, кодируемые указанной нуклеиновой кислотой, а также способы применения указанной нуклеиновой кислоты для увеличения устойчивости растений к гербицидам-ингибиторам HPPD, в частности увеличенной устойчивости к гербицидам-ингибиторам HPPD, относящимся к классу N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамидов, N-(тетразол-4-ил)- или N-(триазол-3-ил)арилкарбоксамидов, таким как 2-хлор-3-этокси-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)бензамид и 2-хлор-3-(метоксиметил)-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)бензамид, к классу трикетонов, таким как темботрион, салкотрион и мезотрион, к классу изоксазолов, таким как изоксафлутол, или к классу пиразолинов, таким как пирасульфотол и топрамезон, в частности, выбранным из темботриона, салкотриона, топрамезона, бициклопилона, тефурилтриона, изоксафлутола и мезотриона), кодирует белок HPPD, который был модифицирован для включения одной или более замен аминокислоты, включая 2, 3, 4, 5, 6 или 7 замен аминокислоты в положениях, соответствующих положениям аминокислот 188, 189, 215, 335, 336, 339 и/или 340 в последовательности SEQ ID NO: 1. Термин "соответствующий" подразумевает положение нуклеотида или аминокислоты по отношению к этому же положению в SEQ ID NO: 1, когда две (или более) последовательности выравнивают с помощью стандартных алгоритмов выравнивания, описанных в настоящей заявке в других местах. Пример выравнивания SEQ ID NO: 1 с аминокислотными последовательностями HPPD из различных видов микроорганизмов и растений показан на фиг. 1. Например, положения аминокислот 188, 189, 215, 335, 336, 339 и 340 в последовательности SEQ ID NO: 1 соответствуют положениям аминокислот 241, 242, 271, 412, 413, 416 и 417, соответственно, HPPD из *Avena saliva* (SEQ ID NO: 63); положениям аминокислот 235, 236, 265, 406, 407, 410 и 411, соответственно, HPPD из *Hordeum vulgare* (SEQ ID NO: 67) и положениям аминокислот 242, 243, 272, 413, 414, 417 и 418, соответственно, HPPD из *Zea mays* (SEQ ID NO: 65). Соответственно, в зависимости от длины рассматриваемой аминокислотной последовательности HPPD, имеющей большее или меньшее количество остатков, чем в последовательности SEQ ID NO: 1, соответствующее аминокислотное положение может быть расположено в положении, отличном от положений 188, 189, 215, 335, 336, 339 и 340 в таком рассматриваемом белке HPPD.

В одном варианте реализации настоящего изобретения HPPD согласно настоящему изобретению модифицировали посредством включения одной или более замен аминокислот, выбранных из группы, состоящей из:

(а) триптофана, глицина или серина в положении аминокислоты, соответствующем положению аминокислоты 188 в последовательности SEQ ID NO: 1;

(б) серина, цистеина или аргинина в положении аминокислоты, соответствующем положению аминокислоты 189 в последовательности SEQ ID NO: 1;

(е) пролина в положении аминокислоты, соответствующем положению аминокислоты 335 в последовательности SEQ ID NO: 1, триптофана в положении аминокислоты, соответствующем положению аминокислоты 336 в последовательности SEQ ID NO: 1, аланина в положении аминокислоты, соответствующем положению аминокислоты 339 в последовательности SEQ ID NO: 1, и глутамина в положении аминокислоты, соответствующем положению аминокислоты 340 в последовательности SEQ ID NO: 1; или

В еще одном варианте реализации HPPD согласно настоящему изобретению содержит последовательность, которая по меньшей мере на 53%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, приведенной в настоящей заявке в SEQ ID NO: 65, при этом указанный HPPD был модифицирован посредством включения замены аминокислоты:

(b) серина в положении аминокислоты, соответствующем положению аминокислоты 335 в последовательности SEQ ID NO: 1, серина в положении аминокислоты, соответствующем положению аминокислоты 336 в последовательности SEQ ID NO: 1, и треонина в положении аминокислоты, соответствующем положению аминокислоты 339 в последовательности SEQ ID NO: 1;

(d) пролина в положении аминокислоты, соответствующем положению аминокислоты 335 в последовательности SEQ ID NO: 1, серина в положении аминокислоты, соответствующем положению аминокислоты 336 в последовательности SEQ ID NO: 1, и глутаминовой кислоты в положении аминокислоты, соответствующем положению аминокислоты 340 в последовательности SEQ ID NO: 1;

(f) пролина в положении аминокислоты, соответствующем положению аминокислоты 335 в последовательности SEO ID NO: 1.

В другом варианте реализации HPPD согласно настоящему изобретению содержит последовательность, которая по меньшей мере на 53%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности, приведенной в настоящей заявке в SEQ ID NO: 57, или кодируется нуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100% идентична нуклеотидной последовательности, приведенной в настоящей заявке в SEQ ID NO: 60. HPPD согласно данному варианту реализации может дополнительно содержать замену аминокислоты:

(b) серин в положении аминокислоты, соответствующем положению аминокислоты 335 в последовательности SEQ ID NO: 1, серин в положении аминокислоты, соответствующем положению аминокислоты 336 в последовательности SEQ ID NO: 1, треонин в положении аминокислоты, соответствующем положению аминокислоты 339 в последовательности SEQ ID NO: 1, и глутамин в положении аминокислоты, соответствующем положению аминокислоты 340 в последовательности SEQ ID NO: 1;

лоты, соответствующем положению аминокислоты 340 в последовательности SEQ ID NO: 1;

(с) триптофан в положении аминокислоты, соответствующем положению аминокислоты 188 в последовательности SEQ ID NO: 1, и триптофан в положении аминокислоты, соответствующем положению аминокислоты 336 в последовательности SEQ ID NO: 1;

(d) пролин в положении аминокислоты, соответствующем положению аминокислоты 335 в последовательности SEQ ID NO: 1, серин в положении аминокислоты, соответствующем положению аминокислоты 336 в последовательности SEQ ID NO: 1, и глутаминовую кислоту в положении аминокислоты, соответствующем положению аминокислоты 340 в последовательности SEQ ID NO: 1;

(е) пролин в положении аминокислоты, соответствующем положению аминокислоты 335 в последовательности SEQ ID NO: 1, триптофан в положении аминокислоты, соответствующем положению аминокислоты 336 в последовательности SEQ ID NO: 1; аланин в положении аминокислоты, соответствующем положению аминокислоты 339 в последовательности SEQ ID NO: 1, и глутамин в положении аминокислоты, соответствующем положению аминокислоты 340 в последовательности SEQ ID NO: 1; или

(f) пролин в положении аминокислоты, соответствующем положению аминокислоты 335 в последовательности SEQ ID NO: 1.

Любая последовательность HPPD может быть модифицирована для включения одной или более замен, описанных в настоящей заявке. Например, HPPD согласно настоящему изобретению также включает любые природные ферменты HPPD бактериального, растительного или животного происхождения, которые были модифицированы для включения одной или более из замен, описанных выше.

При определении белка HPPD согласно настоящему изобретению, начальная аминокислотная последовательность существующего белка должна быть модифицирована человеком путем замены по меньшей мере одной аминокислоты, определенной в настоящей заявке, при этом наиболее удобным способом модификации ДНК, кодирующей такой белок, является замена определенного кодона другим кодоном, кодирующим другую аминокислоту.

Примеры последовательностей HPPD, которые могут быть модифицированы в соответствии с настоящим изобретением, включают последовательности из бактерий, например, из видов рода *Pseudomonas*, например *Pseudomonas fluorescens*, или других цианобактерий рода *Synechocystis*. Последовательность также может быть растительного происхождения, в частности получена из двудольных растений, зонтичных растений или других однодольных растений. Подходящие примеры, которые могут быть упомянуты, включают такие растения, как табак, *Arabidopsis*, *Daucus carotta*, *Zea mays* (кукуруза), пшеница, ячмень, *Avena sativa*, *Brachiaria platyphylla*, *Cenchrus echinatus*, *Lolium rigidum*, *Festuca arundinacea*, *Setaria faberi*, *Eleusine indica*, *Sorghum*, *Cenchrus echinatus*, *Festuca arundinacea*. Кодированные последовательности, а также способ их выделения и клонирования, известны в данной области техники или описаны в настоящей заявке в других местах (например, SEQ ID NO: 63-76). В конкретном варианте реализации настоящего изобретения HPPD, который может быть модифицирован в соответствии с настоящим изобретением, имеет бактериальное происхождение, в частности HPPD из видов рода *Pseudomonas*, более предпочтительно из *Pseudomonas fluorescens*, *Rhodococcus* sp., *Blepharisma japonicum*, *Synechococcus* sp., *Picrophilus torridus*, *Kordia algicida*, или растительное происхождение, включая *Arabidopsis thaliana*, *Sorghum bicolor*, *Oryza sativa*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Lolium rigidum* или *Avena sativa*.

Применительно к целям настоящего изобретения HPPD согласно настоящему изобретению также может содержать другие модификации, например, те, в которых некоторые аминокислоты (например, от 1 до 10 аминокислот) были замещены, добавлены или удалены в целях клонирования, чтобы обеспечить получение промежуточного гибридного белка и т.п., который сохраняет активность HPPD, т.е. свойство катализировать превращение пара-гидроксифенилпирувата в гомогентисат, или может представлять собой любой HPPD, который может быть дополнительно улучшен. Например, HPPD, который может быть дополнительно улучшен с помощью модификаций, описанных в настоящей заявке, может представлять собой вариант HPPD, полученный из *Pseudomonas fluorescens*, приведенный в настоящей заявке как SEQ ID NO: 2, вариант HPPD из *Avena sativa*, приведенный в настоящей заявке как SEQ ID NO: 64, вариант последовательностей HPPD, приведенных в настоящей заявке в любой из SEQ ID NO: 3-326, 383-389, 393, 395, 397-459, и в международной заявке на патент WO 2012/021785, которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки; последовательности HPPD, приведенные в любой из SEQ ID NO: 2-14 и 20-50 в международной заявке на патент WO 2011/068567, которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки; последовательности HPPD, приведенные в любой из SEQ ID NO: 15-26 в международной заявке на патент WO 2010/085705, которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки; HPPD, содержащий одну или более замен, описанных в WO 09/144079 или патенте США №6245968, каждый из которых полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки; HPPD, содержащий одну или более из замен, описанных в табл. 1, 2, 5 или 6 в WO 2010/085705; и/или HPPD, содержащий одну или более из замен, описанных в табл. 1 в WO 2011/068567.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нуклеотидная последовательность согласно настоящему изобретению (включая ее выделенные, рекомбинантные и химерные гены, векторы, клетки-хозяева, растения, части растений и семена, содержащие последовательность нуклеино-

вой кислоты, аминокислотные последовательности и их композиции, кодируемые последовательностью нуклеиновой кислоты, а также способы применения последовательности нуклеиновой кислоты для увеличения устойчивости растений к гербицидам-ингибиторам HPPD, в частности увеличения устойчивости к гербицидам-ингибиторам HPPD, относящимся к классу N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамидов, N-(тетразол-4-ил)- или N-(триазол-3-ил)арилкарбоксамидами, таким как 2-хлор-3-этокси-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)бензамид и 2-хлор-3-(метоксиметил)-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)бензамид, к классу трикетонов, таким как темботрион, салкотрион и мезотрион, к классу изоксазолов, таким как изоксафлутол, или к классу пиразолинов, таким как пиразульфотол и топрамезон, в частности, выбранным из темботриона, салкотриона, топрамезона, бициклопирона, тефурилтриона, изоксафлутола и мезотриона) кодирует аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 3-59, и ее фрагменты и варианты, кодирующие полипептид, придающий устойчивость к гербициду-ингибитору HPPD. Следовательно, в указанном варианте реализации, HPPD согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 3-59, и ее фрагменты и варианты, которые придают устойчивость к гербицидам-ингибиторам HPPD в клетке-хозяине.

А. Способы измерения устойчивости к ингибитору HPPD

Любой подходящий способ для измерения устойчивости к гербицидам-ингибиторам HPPD может быть использован для оценки последовательностей HPPD согласно настоящему изобретению. Устойчивость можно оценить, посредством измерения способности клетки или организма выживать при применении конкретного гербицида-ингибитора HPPD либо способность осуществлять жизненно важные клеточные функции, такие как фотосинтез, синтез белка или дыхание и размножение, способом, который явно не отличается от такового у необработанных клеток или организмов, либо способность не иметь существенных отличий в урожайности или даже увеличении урожайности для растений, обработанных таким гербицидом-ингибитором HPPD, по сравнению с растениями этого же вида, не обработанными таким гербицидом (в том случае, когда сорные растения были удалены или их рост был предотвращен с помощью механизма, отличного от применения гербицида-ингибитора HPPD). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения устойчивость можно измерить в соответствии с видимым индикаторным фенотипом клетки или организма, трансформированного нуклеиновой кислотой, содержащей ген, кодирующий соответствующий белок HPPD, или с помощью количественного исследования в условиях *in vitro* белка HPPD в присутствии различных концентраций разных ингибиторов HPPD. Зависимость интенсивности ответа от дозы и относительные сдвиги дозозависимых ответов, связанных с этими индикаторными фенотипами (образование коричневого цвета, ингибирование роста, обесцвечивание, гербицидный эффект и т.д.), обычно выражают в виде величины, например, GR₅₀ (концентрация, вызывающая 50% снижение роста) или MIC (минимальная ингибирующая концентрация), где увеличение величины соответствует увеличению внутренней устойчивости экспрессированного HPPD, используя обычный способ на основании повреждения растения, меристематических симптомов обесцвечивания и т.д., в диапазоне различных концентраций гербицидов. Эти данные могут быть выражены посредством, например, значений GR₅₀, полученных из кривых доза/ответ, при нанесении значений "дозы" на ось абсцисс и "процента гибели", "гербицидного эффекта", "числа возникающих зеленых растений" и т.д. на ось ординат, причем увеличенные значения GR₅₀ соответствуют увеличенным уровням внутренней устойчивости экспрессированного HPPD. Гербициды можно применять соответствующим образом перед прорастанием и после прорастания (довсходовое и послевсходовое применение).

В различных вариантах реализации настоящего изобретения уровень устойчивости нуклеиновой кислоты или гена, кодирующего белок HPPD в соответствии с настоящим изобретением, или белка HPPD согласно настоящему изобретению может быть подвергнут скринингу с помощью трансгенеза, регенерации, селекции и исследования тестируемого растения, такого как табак, или сельскохозяйственной культуры, такой как соя или хлопчатник, с использованием распылительной установки. В соответствии с результатами, полученными с помощью такого скрининга, такие растения являются более устойчивыми, желательными устойчивыми к дозе, превышающей по меньшей мере в 2 раза нормальную дозу, рекомендованную для применения в полевых условиях, еще более предпочтительно устойчивыми к дозе, которая не более чем в 4 раза выше дозы, рекомендованной для применения в полевых условиях, к ингибиторам HPPD (например, гербицидам-ингибиторам HPPD, относящимся к классу N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамидов, N-(тетразол-4-ил)- или N-(триазол-3-ил)арилкарбоксамидами, таким как 2-хлор-3-этокси-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)бензамид и 2-хлор-3-(метоксиметил)-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)бензамид, к классу трикетонов, таким как темботрион, салкотрион и мезотрион, к классу изоксазолов, таким как изоксафлутол, или к классу пиразолинов, таким как пиразульфотол и топрамезон, в частности, выбранным из темботриона, салкотриона, топрамезона, бициклопирона, тефурилтриона, изоксафлутола и мезотриона), чем растения этого же вида, которые не содержат какого-либо экзогенного гена, кодирующего белок HPPD, или растения этого же вида, которые содержат ген, содержащий стандартную HPPD-кодирующую ДНК, например, HPPD-кодирующую ДНК *Arabidopsis thaliana*, под контролем того же промотора, что и нуклеиновая кислота, кодирующая белок HPPD согласно настоящему изобретению. Соответственно термин "способен увеличить устойчивость

растения по меньшей мере к одному гербициду, действующему на HPPD" обозначает устойчивость растения, экспрессирующего HPPD согласно настоящему изобретению, к дозе, которая по меньшей мере в 2, или 3, или 4 раза или более превышает нормальную дозу гербицида-ингибитора HPPD для применения в полевых условиях, по сравнению с растением, экспрессирующим только эндогенный HPPD, или растением, экспрессирующим стандартный фермент HPPD. В этой связи, термин "гербицид, действующий на HPPD" не ограничивается веществами, которые известны и/или используются в качестве гербицидов, и включает любые вещества, которые ингибируют каталитическую активность белков HPPD.

В другом варианте при проведении количественных исследований данные, такие как значения PI_{50} (значение PI_{50} относится к значению логарифма концентрации ингибитора, необходимой для ингибирования на 50% активности фермента в молярной концентрации), могут быть получены для белка HPPD согласно настоящему изобретению и сопоставлены с данными для стандартной последовательности HPPD в присутствии или в отсутствие любого соответствующего гербицида-ингибитора HPPD.

Колориметрический анализ представляет собой конкретный, но не ограничивающийся им, тип количественного исследования, который можно использовать для оценки последовательности HPPD согласно настоящему изобретению. В этом исследовании культуральную среду, типа YT-бульона, с добавлением 1% агарозы, 5 mM L-тирозина и 42 mM сукцината, которая содержит селективный агент для вектора pSE420 (Invitrogen, Карлсруэ, Германия) или модифицированной версии pSE420 (pSE420(RI)NX), выливают в планшеты с глубокими лунками. В каждую лунку вносят культуру *E. coli* в экспоненциальной фазе роста, которая содержит вектор pSE420-HPPDx (HPPDx означает любой ген, кодирующий предполагаемый фермент/белок HPPD). Через 16 часов инкубации при 37°C лунки, не содержащие культуральной среды, и лунки, в которые была высеяна культура *E. coli*, содержащая пустой вектор pSE420, являются прозрачными, или лунки, в которые была высеяна культура *E. coli*, содержащая вектор pSE420-HPPDx, содержащий ген, кодирующий неактивный HPPD, являются прозрачными, тогда как лунки, в которые была высеяна культура *E. coli*, содержащая вектор pSE420-HPPDx, кодирующий активный HPPD, являются коричневыми. Ранее было продемонстрировано, что это исследование отражает активность HPPD, независимо от механизма данной активности, и позволяет выявить виды активности HPPD (патент США №6768044), например, на качественном уровне.

В. Способы введения мутаций в последовательности HPPD

В мутантном белке HPPD, кодируемом нуклеиновой кислотой согласно настоящему изобретению, по меньшей мере одна аминокислота была заменена, как определено выше. Замена может быть осуществлена в последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует стандартный HPPD, определенный выше, с помощью любых способов, которые подходят для замены в указанной последовательности кодона, который кодирует аминокислоту, подлежащую замене, кодоном, который соответствует аминокислоте, которая должна ее заменить, при этом указанные кодоны широко описаны в литературе и хорошо известны специалистам в данной области техники.

Для осуществления такой замены можно использовать несколько способов молекулярной биологии. Подходящий способ получения мутантной последовательности нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению и соответствующего белка включает проведение сайт-направленного мутагенеза кодонов, кодирующих одну или более аминокислот, которые выбраны заранее. Способы получения таких сайт-направленных мутаций хорошо известны специалистам в данной области техники и широко описаны в литературе (в частности: Directed Mutagenesis: A Practical Approach, 1991, Edited by M.J. McPHERSON, IRL PRESS), или представляют собой способы, для осуществления которых можно использовать коммерческие наборы (например, набор для быстрого мутагенеза QuikChange™ от Qiagen). После проведения сайт-направленного мутагенеза целесообразно отобрать клетки, которые содержат мутантный HPPD, менее чувствительный к ингибитору HPPD, с использованием соответствующего способа вспомогательного скрининга. Соответствующие способы скрининга для достижения этой цели были описаны выше.

В другом варианте последовательность ДНК, кодирующая стандартный HPPD, может быть модифицирована *in silico*, чтобы кодировать белок HPPD, содержащий одну или более замен, перечисленных в настоящей заявке, с последующим синтезом *de novo*. Нуклеотидная последовательность, кодирующая мутантный белок HPPD, может быть введена в клетку-хозяина, как описано в настоящей заявке в другом месте. А. Выделенные полинуклеотиды и их варианты и фрагменты

Согласно некоторым вариантам реализации настоящее изобретение включает выделенные или рекомбинантные полинуклеотиды. В настоящей заявке "выделенный" или "рекомбинантный" полинуклеотид или полипептид/белок или его биологически активная часть более не присутствует в своем первоначальном, природном организме, например, в случае содержания в гетерологичной клетке-хозяине или в трансгенной клетке растения, семени или растении. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения "выделенный" полинуклеотид не содержит последовательностей (например, кодирующих белок последовательностей или регуляторных последовательностей), которые фланкируют нуклеиновую кислоту в природных условиях (например, последовательности, расположенные на 5'- и 3'-концах нуклеиновой кислоты) в геномной ДНК организма, из которого получен полинуклеотид. Термин "рекомби-

нантный" включает полинуклеотиды или полипептиды, которые были модифицированы по отношению к нативному полинуклеотиду или полипептиду, так что полинуклеотид или полипептид отличается (например, по химическому составу или структуре) от природного. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения "выделенный" или "рекомбинантный" полинуклеотид не содержит внутренних последовательностей (т.е. интронов), которые присутствуют в природной геномной ДНК организма, из которого получен полинуклеотид. Типичным примером такого полинуклеотида является так называемая комплементарная ДНК (кДНК). Например, в различных вариантах реализации, выделенный полинуклеотид, кодирующий белок, придающий устойчивость к гербициду-ингибитору HPPD, может содержать менее приблизительно 5 тыс. п.о., 4 тыс. п.о., 3 тыс. п.о., 2 тыс. п.о., 1 тыс. п.о., 0,5 тыс. п.о. или 0,1 тыс. п.о. нуклеотидной последовательности, которая в природных условиях фланкирует полинуклеотид в геномной ДНК клетки, из которой получен указанный полинуклеотид. Молекулы нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению включают те, которые кодируют HPPD согласно настоящему изобретению, включая, например, нуклеотидные последовательности, приведенные в любой из SEQ ID NO: 60-62. Настоящее изобретение также включает варианты и фрагменты любой последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотные последовательности, приведенные в любой из SEQ ID NO: 3-59. "Фрагмент" полинуклеотида может кодировать биологически активную часть полипептида, или это может быть фрагмент, который можно применять в качестве зонда для гибридизации или праймера для ПНР с использованием способов, раскрытых в настоящей заявке в других местах. Полинуклеотиды, которые представляют собой фрагменты полинуклеотида, содержат по меньшей мере приблизительно 15, 20, 50, 75, 100, 200, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150 смежных нуклеотидов, или количество, которое не превышает количество нуклеотидов, содержащихся в полноразмерном полинуклеотиде, раскрытом в настоящей заявке, в зависимости от предполагаемого применения (например, нуклеиновая кислота HPPD, раскрытая в настоящей заявке). Под термином "смежные" нуклеотиды подразумевают нуклеотидные остатки, которые непосредственно примыкают друг к другу.

Фрагменты полинуклеотидов согласно настоящему изобретению в целом будут кодировать полипептидные фрагменты, которые сохраняют биологическую активность полноразмерного белка, придающего устойчивость к гербицидам-ингибиторам HPPD; т.е. активность, обеспечивающую устойчивость к гербицидам. Под термином "сохраняет активность, обеспечивающую устойчивость к гербициду" подразумевается, что активность фрагмента будет составлять по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80, 85, 90, 95, 100, 110, 125, 150, 175, 200, 250%, по меньшей мере приблизительно 300% или более от активности, обеспечивающей устойчивость к гербицидам, полноразмерного белка, придающего устойчивость к гербицидам-ингибиторам HPPD, раскрытого в настоящей заявке в SEQ ID NO: 2. Способы измерения активности, обеспечивающей устойчивость к гербицидам, хорошо известны в данной области техники, и типичные способы описаны в настоящей заявке. В качестве неограничивающего примера фрагмент согласно настоящему изобретению будет устойчив к той же дозе гербицида-ингибитора HPPD или устойчив к дозе, которая в 2, 3, 4 раза или более превышает дозу гербицида-ингибитора HPPD, или указанные фрагменты будут в той же степени или более устойчивы на основании величин rI_{50} или K_i между фрагментом и SEQ ID NO: 2.

Фрагмент полинуклеотида, который кодирует биологически активную часть полипептида согласно настоящему изобретению, будет кодировать по меньшей мере приблизительно 150, 175, 200, 250, 300, 350 смежных аминокислот, или количество аминокислот, которое не превышает общее количество аминокислот, присутствующих в полноразмерном полипептиде согласно настоящему изобретению. В неограничивающем примере фрагмент полинуклеотида, который кодирует биологически активную часть полипептида согласно настоящему изобретению, содержит одну или более аминокислот в положениях 188, 189, 215, 335, 336, 339 и 340 последовательности SEQ ID NO: 2.

Настоящее изобретение также включает варианты полинуклеотида, описанного выше. Термин "варианты" полинуклеотида также включает те последовательности, которые кодируют HPPD согласно настоящему изобретению, но которые отличаются умеренно из-за вырожденности генетического кода, а также те, которые идентичны в достаточной степени. Варианты согласно настоящему изобретению будут сохранять активность фермента HPPD и устойчивость к гербициду-ингибитору HPPD. Термин "идентичен в достаточной степени" подразумевает последовательность полипептида или полинуклеотида, которая имеет по меньшей мере приблизительно 60 или 65% идентичность последовательности, приблизительно 70 или 75% идентичность последовательности, приблизительно 80 или 85% идентичность последовательности, приблизительно 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичность последовательности по сравнению со стандартной последовательностью, при определении с помощью одной из программ для выравнивания, используя стандартные параметры. Специалисту в данной области техники будет понятно, что эти значения могут быть соответствующим образом скорректированы, чтобы определить соответствующую идентичность полипептидов, кодируемых двумя полинуклеотидами с учетом вырожденности кодонов, сходства аминокислот, положения рамки считывания и т.п. Бактериальные гены достаточно часто обладают несколькими иницирующими кодонами, кодирующими метионин, в непосред-

ственной близости от начала открытой рамки считывания. Обычно инициация трансляции в одном или более из этих иницирующих кодонов ведет к синтезу функционального белка. Такие иницирующие кодоны могут включать кодоны ATG. Однако бактерии, такие как виды рода *Bacillus*, также распознают кодон GTG как старт-кодон, и белки, у которых кодон GTG иницирует трансляцию, содержат метионин в качестве первой аминокислоты. Кроме того, не часто можно определить а priori, какие из этих кодонов используются у бактерий в природных условиях. Таким образом, следует понимать, что использование одного из альтернативных кодирующих метионин кодонов может привести к синтезу вариантов, которые придают устойчивость к гербициду. Такие белки, придающие устойчивость к гербициду, включены в область настоящего изобретения и могут быть использованы в способах согласно настоящему изобретению. Природные аллельные варианты могут быть выявлены с использованием хорошо известных способов молекулярной биологии, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и способы гибридизации, описанные ниже. Варианты полинуклеотидов также включают полинуклеотиды, полученные синтетическим путем, например, с помощью стратегий сайт-направленного или другого мутагенеза, но все еще кодируют полипептид, обладающий желаемой биологической активностью.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что изменения могут быть введены путем дальнейшего введения мутаций в полинуклеотиды согласно настоящему изобретению, приводя тем самым к дальнейшему изменению аминокислотной последовательности кодируемых полипептидов, без изменения биологической активности полипептидов. Таким образом, варианты выделенных полинуклеотидов могут быть созданы путем введения одной или более дополнительных нуклеотидных замен, инсерций или делеций, в соответствующий полинуклеотид, кодирующий HPPD согласно настоящему изобретению, например, так, что 1-5, 1-10 или 1-15 замен аминокислоты, инсерций или делеций, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 замен аминокислоты, инсерций или делеций вводят в кодируемый полипептид. Дальнейшие мутации могут быть введены с помощью стандартных методик, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез или методик перестановки генов. Такие варианты полинуклеотидов также включены в область настоящего изобретения.

Варианты полинуклеотидов могут быть получены путем введения мутаций случайным образом вдоль всей или части кодирующей последовательности, например, путем насыщающего мутагенеза или перестановочного мутагенеза, и полученные мутанты могут быть подвергнуты скринингу для определения их способности придавать активность, обеспечивающую устойчивость к гербициду, чтобы выявить мутантов, которые сохраняют активность.

Дополнительные способы получения вариантов включают те, при которых, клетку, экспрессирующую белок, раскрытый в настоящей заявке (или его библиотеку), подвергают действию конкретного условия, которое является стрессовым по отношению к активности белка. Конкретные условия могут включать (но не ограничиваются ими) изменения температуры, изменения pH и изменения концентраций субстратов или ингибиторов. Библиотека белков может быть подвергнута воздействию этих условий в течение периода экспрессии белка (например, в *E.coli* или другом хозяине) или после получения белкового экстракта, или после очистки белка.

Функциональная или ферментативная активность библиотеки белков, которая была подвергнута стрессовому условию, затем может быть сопоставлена с таковой для стандартного белка, чтобы выявить белки с улучшенными свойствами. Такое сравнение активности может быть осуществлено как часть скрининга роста или, в другом варианте, как часть ферментативного количественного исследования, в котором количественно оценивается активность белка. Свойства, которые могут быть выявлены как улучшенные, могут включать устойчивость к гербицидам-ингибиторам HPPD, изменения кинетических констант (включая K_m , K_i , V_{max}), стабильность белка, термостабильность белка или температурный оптимум белка.

С. Выделенные белки и их варианты и фрагменты

Полипептиды, придающие устойчивость к гербициду, также включены в объем настоящего изобретения. Полипептид, придающий устойчивость к гербициду, включает препараты полипептидов, содержащие менее приблизительно 30, 20, 10 или 5% (в пересчете на сухой вес) полипептида, не придающего устойчивость к гербициду (также называемый в настоящей заявке "загрязняющий белок"). Согласно настоящему изобретению "белок, придающий устойчивость к гербициду" подразумевает полипептид HPPD, раскрытый в настоящей заявке. Фрагменты, биологически активные части и варианты указанного полипептида также включены в область настоящего изобретения и могут быть применены при практической реализации способов согласно настоящему изобретению.

"Фрагменты" или "биологически активные части" включают фрагменты полипептида, содержащие часть аминокислотной последовательности, которая кодирует белок, придающий устойчивость к гербициду, и часть, которая сохраняет активность, обеспечивающую устойчивость к гербициду. Биологически активная часть белка, придающего устойчивость к гербициду, может представлять собой полипептид, который содержит, например, 10, 25, 50, 100 или более аминокислот в длину. Такие биологически активные части могут быть получены с помощью рекомбинантных методик и исследованы для определения их активности, обеспечивающей устойчивость к гербициду. Термин "варианты" подразумевает белки или полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере прибли-

тельно на 60, 65, приблизительно 70, 75, приблизительно 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 3-59, при этом указанный вариант имеет ферментативную активность HPPD и устойчивость к гербицидам-ингибиторам HPPD. Специалисту в данной области техники будет понятно, что эти значения могут быть соответствующим образом скорректированы, чтобы определить соответствующую идентичность полипептидов, кодируемых двумя полинуклеотидами с учетом вырожденности кодонов, сходства аминокислот, положения рамки считывания и т.п.

Например, консервативные замены аминокислоты могут быть сделаны в одном или более незначимых аминокислотных остатков. "Незначимый" аминокислотный остаток представляет собой остаток, который может быть изменен в стандартной последовательности полипептида без изменения биологической активности, в то время как "значимый" аминокислотный остаток необходим для биологической активности. "Консервативная замена аминокислоты" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, были определены в данной области техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Замены аминокислоты могут быть сделаны в неконсервативных участках, которые сохраняют функцию. В целом, такие замены не могут быть сделаны для консервативных аминокислотных остатков, либо для аминокислотных остатков, находящихся в пределах консервативного мотива, в котором такие остатки являются значимыми для активности полипептида. Тем не менее, специалисту в данной области техники будет понятно, что функциональные варианты могут иметь незначительные консервативные или неконсервативные изменения в консервативных остатках.

В область настоящего изобретения также включены антитела к HPPD согласно настоящему изобретению или к его вариантам или фрагментам. Способы получения антител хорошо известны в данной области техники (см, например, Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; патент США № 4196265).

Таким образом, один аспект настоящего изобретения относится к антителам, одноцепочечным антигенсвязывающим молекулам или другим белкам, которые специфически связываются с одним или более из белков или пептидных молекул согласно настоящему изобретению и их гомологами, гибридами или фрагментами. В особенно предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения антитело специфически связывается с белком, содержащим аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3-59, или ее фрагмент. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитело специфически связывается с гибридным белком, содержащим аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3-59, или ее фрагмента. Антитела согласно настоящему изобретению можно применять для количественного или качественного детектирования белка или пептидной молекулы согласно настоящему изобретению, или для детектирования посттрансляционной модификации белков. В настоящей заявке антитело или пептид "специфически связывается" с белком или пептидной молекулой согласно настоящему изобретению, если такое связывание не ингибируется конкурентным образом в присутствии неродственных молекул.

D. Стэкинг генов

При промышленном производстве сельскохозяйственных культур желательным является устранение, в условиях надежного контроля использования пестицидов, нежелательных растений (например, "сорных растений") с поля сельскохозяйственных культур. Наиболее подходящим вариантом обработки будет тот, который может быть применен ко всему полю, но при этом будет устранять только нежелательные растения, не оказывая влияния на сельскохозяйственные культуры. Одна из таких систем обработки будет включать использование сельскохозяйственных культур, которые устойчивы к гербициду, так, что при распылении гербицида на поле с сельскохозяйственными культурами, устойчивыми к гербициду, сельскохозяйственные культуры будут продолжать развиваться, в то время как сорные растения, не устойчивые к гербициду, погибают или серьезно повреждаются. В наиболее подходящем варианте такие системы обработки будут обладать преимуществами в отношении изменяющихся свойств гербицида, так, что такой способ борьбы с сорными растениями может обеспечить оптимальное сочетание гибкости и экономичности. Например, отдельные гербициды имеют различную длительность сохранения в полевых условиях, при этом некоторые гербициды сохраняются и являются эффективными в течение относительно длительного периода времени после их применения на поле, тогда как другие гербициды быстро разрушаются с образованием других и/или неактивных соединений. Наиболее подходящая система обработки позволит использовать различные гербициды, так что производители могут оптимизировать выбор гербицидов в конкретной ситуации.

В то время как ряд сельскохозяйственных культур, устойчивых к гербицидам, в настоящее время доступен коммерчески, проблема, которая возникла в отношении многих коммерческих гербицидов и

комбинаций гербицид/сельскохозяйственная культура, заключается в том, что отдельные гербициды обычно имеют неполный спектр активности против распространенных видов сорных растений. Для большинства отдельных гербицидов, которые использовались в течение некоторого времени, популяции устойчивых к гербицидам видов сорных растений и биотипов стали более распространенными (см., например, Tranel and Wright (2002) *Weed Science* 50: 700-712; Owen and Zelaya (2005) *Pest Manag. Sci.* 61: 301-311). Были описаны трансгенные растения, которые устойчивы более чем к одному гербициду (см., например, WO 2005/012515). Однако постоянно требуются улучшения каждого аспекта растениеводства, способов борьбы с сорными растениями, расширение способов борьбы с остаточными сорными растениями и улучшение урожайности.

Белок HPPD или нуклеотидная последовательность согласно настоящему изобретению успешно комбинируется в растениях с другими генами, которые кодируют белки или РНК, придающие таким растениям полезные агротехнические свойства. Среди генов, которые кодируют белки или РНК, придающие трансформированным растениям полезные агротехнические свойства, можно упомянуть последовательности ДНК, кодирующие белки, которые придают устойчивость к одному или более гербицидам, которые, в зависимости от их химической структуры, отличаются от гербицидов-ингибиторов HPPD, и другие гены, которые придают устойчивость к определенным насекомым, гены, которые придают устойчивость к определенным заболеваниям, ДНК, которые кодируют РНК, подходящие для борьбы с нематодами или насекомыми, и т.п.

Такие гены, в частности, описаны в публикациях заявок на патент PCT WO 91/02071 и WO 95/06128, в патенте США №7923602 и заявке на патент США №20100166723, которые полностью включены в настоящую заявку посредством ссылок. Среди последовательностей ДНК, кодирующих белки, которые придают трансформированным клеткам растения и растениям устойчивость к определенным гербицидам, можно упомянуть ген *bar* или *PAT*, или ген *Streptomyces coelicolor*, описанный в WO 2009/152359, который придает устойчивость к гербицидам на основе глюфофината, ген, кодирующий подходящий EPSPS, который придает устойчивость к гербицидам, мишенью которых является EPSPS, таким как глифосат и его соли (US 4535060, US 4769061, US 5094945, US 4940835, US 5188642, US 4971908, US 5145783, US 5310667, US 5312910, US 5627061 US 5633435), ген, кодирующий глифосат-ацетилтрансферазу (например, US 8222489, US 8088972, US 8044261, US 8021857, US 8008547, US 7999152, US 7998703, US 7863503, US 7714188, US 7709702, US 7666644, US 7666643, US 7531339, US 7527955 и US 7405074), или ген, кодирующий глифосатоксидоредуктазу (например, US 5463175).

Среди последовательностей ДНК, кодирующих подходящий EPSPS, которые придают устойчивость к гербицидам, мишенью которых является EPSPS, более конкретно стоит упомянуть ген, который кодирует EPSPS растений, в частности EPSPS кукурузы, в частности EPSPS кукурузы, который содержит две мутации, в частности мутацию в аминокислотном положении 102 и мутацию в аминокислотном положении 106 (WO 2004/074443), и который описан в заявке на патент США №6566587, далее называемый двойной мутант EPSPS кукурузы или 2mEPSPS, или ген, который кодирует EPSPS, выделенный из *Agrobacterium*, и описан последовательностями SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, приведенными в патенте США №5633435, также названный CP4. Среди последовательностей ДНК, кодирующих подходящий EPSPS, которые придают устойчивость к гербицидам, мишенью которых является EPSPS, более конкретно стоит упомянуть ген, который кодирует EPSPS GRG23 из *Arthrobacter globiformis*, а также мутанты GRG23 ACE1, GRG23 ACE2 или GRG23 ACE3, в частности мутанты или варианты GRG23, описанные в WO 2008/100353, такие как GRG23(ace3)R173K, имеющий последовательность SEQ ID NO: 29, раскрытую в WO 2008/100353.

В случае последовательностей ДНК, кодирующих EPSPS, и более конкретно кодирующих вышеуказанные гены, перед последовательностью, кодирующей эти ферменты, предпочтительно расположена последовательность, кодирующая транзитный пептид, в частности "оптимизированный транзитный пептид", описанный в патентах США № 5510471 или № 5633448.

Типичные характеристики устойчивости к гербицидам, которые можно комбинировать с последовательностью нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, дополнительно включают по меньшей мере один ингибитор ALS (ацетолактатсинтазы) (WO 2007/024782); мутантный ген ALS/AHAS из *Arabidopsis* (патент США № 6855533); гены, кодирующие 2,4-D-монооксигеназы, придающие устойчивость к 2,4-D-2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоте посредством ее метаболизирования (патент США № 6153401); и гены, кодирующие дикамба-монооксигеназы, придающие устойчивость к дикамба-3,6-дихлор-2-метоксибензойной кислоте посредством ее метаболизирования (US 2008/0119361 и US 2008/0120739).

В различных вариантах реализации HPPD согласно настоящему изобретению состыкован с одним или более генами, придающими устойчивость к гербицидам, включая один или более дополнительных генов, придающих устойчивость к гербицидам-ингибиторам HPPD, и/или один или более генов, придающих устойчивость к глифосату, и/или глюфофинату. В одном варианте реализации HPPD согласно настоящему изобретению комбинируют с 2mEPSPS и *bar*.

Среди последовательностей ДНК, кодирующих белки, имеющие отношение к свойствам устойчивости к насекомым, следует более конкретно упомянуть белки Bt, широко описанные в литературе и хо-

рошо известные специалистам в данной области техники. Также следует упомянуть белки, экстрагированные из бактерий, таких как *Photobacterium* (WO 97/17432 и WO 98/08932).

Среди таких последовательностей ДНК, кодирующих белки, представляющие интерес, которые придают новые свойства устойчивости к насекомым, следует более конкретно упомянуть Bt Cry или белки VIP, широко описанные в литературе и хорошо известные специалистам в данной области техники. Они включают белок Cry1F или гибриды, полученные из белка Cry1F (например, гибридные белки Cry1A-Cry1F, описанные в US 6326169, US 6281016, US 6218188, или их токсичные фрагменты), белки типа Cry1A или их токсичные фрагменты, предпочтительно белок CryAc или гибриды, полученные из белка Cry1Ac (например, гибридный белок Cry1Ab-Cry1Ac, описанный в US 5880275), или белок Cry1Ab или Bt2 или его инсектицидные фрагменты, описанные в EP451878, белки Cry2Ae, Cry2Af или Cry2Ag, описанные в WO 02/057664, или их токсичные фрагменты, белок Cry1A. 105, описанный в WO 2007/140256 (SEQ ID NO: 7), или его токсичный фрагмент, белок VIP3Aa19, имеющий номер доступа NCBI ABG20428, белок VIP3Aa20, имеющий номер доступа NCBI ABG20429 (SEQ ID NO: 2 в WO 2007/142840), белки VIP3A, продуцируемые в COT202 или COT203 трансформантах хлопчатника (WO 2005/054479 и WO 2005/054480, соответственно), белки Cry, описанные в WO 01/47952, белок VIP3Aa или его токсический фрагмент, описанный в Estruch et al. (1996), Proc Natl Acad Sci USA. 28;93(11): 5389-94 и патенте США № 6291156, инсектицидные белки из *Xenorhabdus* (описанные в WO 98/50427), *Serratia* (в частности, из *S. entomophila*) или штаммов видов *Photobacterium*, такие как Tc-белки из *Photobacterium*, описанные в WO 98/08932 (например, Waterfield et al., 2001, Appl Environ Microbiol. 67(11): 5017-24; French-Constant and Bowen, 2000, Cell Mol Life Sci.; 57(5): 828-33). В область настоящего изобретения также включены любые варианты или мутанты любого из указанных белков, отличающиеся некоторыми (1-10, предпочтительно 1-5) аминокислотными остатками от любой из вышеуказанных последовательностей, в частности от последовательности их токсического фрагмента, или те, которые слиты с транзитным пептидом, таким как транзитный пептид пластид, или другим белком или пептидом.

В различных вариантах реализации последовательность HPPD согласно настоящему изобретению можно комбинировать в растениях с одним или более генами, придающими желаемую характеристику, такую как устойчивость к гербицидам, устойчивость к насекомым, засухоустойчивость, устойчивость к нематодам, эффективное использование воды, эффективное использование азота, улучшенная питательная ценность, устойчивость к заболеваниям, улучшенный фотосинтез, улучшенное качество волокна, устойчивость к стрессам, улучшенное воспроизводство и т.п.

Особенно подходящие трансгенные объекты, которые можно комбинировать с генами согласно настоящему изобретению в растениях одного и того же вида (например, путем скрещивания или путем повторной трансформации растения, содержащего другой трансгенный объект, с использованием химерного гена согласно настоящему изобретению), включают объект 531/PV-GHVK04 (хлопчатник, борьба с насекомыми, описан в WO 2002/040677), объект 1143-14A (хлопчатник, борьбы с насекомыми, не депонирован, описан в WO 06/128569); объект 1143-51B (хлопчатник, борьба с насекомыми, не депонирован, описан в WO 06/128570); объект 1445 (хлопчатник, устойчивость к гербициду, не депонирован, описан в US-A 2002-120964 или WO 02/034946); объект 17053 (рис, устойчивость к гербициду, депонирован под номером PTA-9843, описан в WO 10/117737); объект 17314 (рис, устойчивость к гербициду, депонирован под номером PTA-9844, описан в WO 10/117735); объект 281-24-236 (хлопчатник, борьба с насекомыми - устойчивость к гербициду, депонирован под номером PTA-6233, описан в WO 05/103266 или US-A 2005-216969); объект 3006-210-23 (хлопчатник, борьба с насекомыми - устойчивость к гербициду, депонирован под номером PTA-6233, описан в US-A 2007-143876 или WO 05/103266); объект 3272 (кукуруза, качественная характеристика, депонирован под номером PTA-9972, описан в WO 06/098952 или US-A 2006-230473); объект 33391 (пшеница, устойчивость к гербициду, депонирован под номером PTA-2347, описан в WO 2002/027004), объект 40416 (кукуруза, борьба с насекомыми - устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-11508, описан в WO 11/075593); объект 43A47 (кукуруза, борьба с насекомыми - устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-11509, описан в WO 11/075595); объект 5307 (кукуруза, борьба с насекомыми, депонирован под номером ATCC PTA-9561, описан в WO 10/077816); объект ASR-368 (полевица, устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-4816, описан в US-A 2006-162007 или WO 04/053062); объект B16 (кукуруза, устойчивость к гербициду, не депонирован, описан в US-A 2003-126634); объект BPS-CV127-9 (соя, устойчивость к гербициду, депонирован под номером NCIMB №41603, описан в WO 10/080829); объект BLR1 (масличный рапс, восстановление мужской стерильности, депонирован под номером NCIMB №41193, описан в WO 2005/074671), объект CE43-67B (хлопчатник, борьба с насекомыми, депонирован под номером DSM ACC2724, описан в US-A 2009-217423 или WO 06/128573); объект CE44-69D (хлопчатник, борьба с насекомыми, не депонирован, описан в US-2010-0024077); объект CE44-69D (хлопчатник, борьба с насекомыми, не депонирован, описан в WO 06/128571); объект CE46-02A (хлопчатник, борьба с насекомыми, не депонирован, описан в WO 06/128572); объект COT102 (хлопчатник, борьба с насекомыми, не депонирован, описан в US-A 2006-130175 или WO 04/039986); объект COT202 (хлопчатник, борьба с насекомыми, не депонирован, описан в US-A 2007-067868 или WO 05/054479); объект COT203 (хлопчатник, борьба с насекомыми, не депонирован, описан в WO 05/054480); объект DAS21606-3/1606 (соя, ус-

тойчивость к гербициду, депонирован под номером PTA-11028, описан в WO 2012/033794), объект DAS40278 (кукуруза, устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-10244, описан в WO 11/022469); объект DAS-44406-6/pDAB8264.44.06.1 (соя, устойчивость к гербициду, депонирован под номером PTA-11336, описан в WO 2012/075426), объект DAS-14536-7/pDAB8291.45.36.2 (соя, устойчивость к гербициду, депонирован под номером PTA-11335, описан в WO 2012/075429), объект DAS-59122-7 (кукуруза, борьба с насекомыми - устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA 11384, описан в US-A 2006-070139); объект DAS-59132 (кукуруза, борьба с насекомыми - устойчивость к гербициду, не депонирован, описан в WO 09/100188); объект DAS68416 (соя, устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-10442, описан в WO 11/066384 или WO 11/066360); объект DP-098140-6 (кукуруза, устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-8296, описан в US-A 2009-137395 или WO 08/112019); объект DP-305423-1 (соя, качественная характеристика, не депонирован, описан в US-A 2008-312082 или WO 08/054747); объект DP-32138-1 (кукуруза, система гибридизации, депонирован под номером ATCC PTA-9158, описан в US-A 2009-0210970 или WO 09/103049); объект DP-356043-5 (соя, устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-8287, описан в US-A 2010-0184079 или WO 08/002872); объект EE-1 (баклажан, борьба с насекомыми, не депонирован, описан в WO 07/091277); объект FI117 (кукуруза, устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC 209031, описан в US-A 2006-059581 или WO 98/044140); объект FG72 (соя, устойчивость к гербициду, депонирован под номером PTA-11041, описан в WO 2011/063413), объект GA21 (кукуруза, устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC 209033, описан в US-A 2005-086719 или WO 98/044140); объект GG25 (кукуруза, устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC 209032, описан в US-A 2005-188434 или WO 98/044140); объект GHB119 (хлопчатник, борьба с насекомыми - устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-8398, описан в WO 08/151780); объект GHB614 (хлопчатник, устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-6878, описан в US-A 2010-050282 или WO 07/017186); объект GJ11 (кукуруза, устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC 209030, описан в US-A 2005-188434 или WO 98/044140); объект GM RZ13 (сахарная свекла, устойчивость к вирусам, депонирован под номером NCIMB-41601, описан в WO 10/076212); объект H7-1 (сахарная свекла, устойчивость к гербициду, депонирован под номером NCIMB 41158 или NCIMB 41159, описан в US-A 2004-172669 или WO 04/074492); объект JOPLIN1 (пшеница, устойчивость к заболеваниям, не депонирован, описан в US-A 2008-064032); объект LL27 (соя, устойчивость к гербициду, депонирован под номером NCIMB41658, описан в WO 06/108674 или US-A 2008-320616); объект LL55 (соя, устойчивость к гербициду, депонирован под номером NCIMB 41660, описан в WO 06/108675 или US-A 2008-196127); объект LLCotton25 (хлопчатник, устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-3343, описан в WO 03/013224 или US-A 2003-097687); объект LLRICE06 (рис, устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC 203353, описан в US-A 6468747 или WO 00/026345); объект LLRice62 (рис, устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC 203352, описан в WO 2000/026345), объект LLRICE601 (рис, устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-2600, описан в US-A 2008-2289060 или WO 00/026356); объект LY038 (кукуруза, качественная характеристика, депонирован под номером ATCC PTA-5623, описан в US-A 2007-028322 или WO 05/061720); объект MIR162 (кукуруза, борьба с насекомыми, депонирован под номером PTA-8166, описан в US-A 2009-300784 или WO 07/142840); объект MIR604 (кукуруза, борьба с насекомыми, не депонирован, описан в US-A 2008-167456 или WO 05/103301); объект MON15985 (хлопчатник, борьба с насекомыми, депонирован под номером ATCC PTA-2516, описан в US-A 2004-250317 или WO 02/100163); объект MON810 (кукуруза, борьба с насекомыми, не депонирован, описан в US-A 2002-102582); объект MON863 (кукуруза, борьба с насекомыми, депонирован под номером ATCC PTA-2605, описан в WO 04/011601 или US-A 2006-095986); объект MON87427 (кукуруза, контроль опыления, депонирован под номером ATCC PTA-7899, описан в WO 11/062904); объект MON87460 (кукуруза, устойчивость к стрессам, депонирован под номером ATCC PTA-8910, описан в WO 09/111263 или US-A 2011-0138504); объект MON87701 (соя, борьба с насекомыми, депонирован под номером ATCC PTA-8194, описан в US-A 2009-130071 или WO 09/064652); объект MON87705 (соя, качественная характеристика - устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-9241, описан в US-A 2010-0080887 или WO 10/037016); объект MON87708 (соя, устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-9670, описан в WO 11/034704); объект MON87712 (соя, урожайность, депонирован под номером PTA-10296, описан в WO 2012/051199), объект MON87754 (соя, качественная характеристика, депонирован под номером ATCC PTA-9385, описан в WO 10/024976); объект MON87769 (соя, качественная характеристика, депонирован под номером ATCC PTA-8911, описан в US-A 2011-0067141 или WO 09/102873); объект MON88017 (кукуруза, борьба с насекомыми - устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-5582, описан в US-A 2008-028482 или WO 05/059103); объект MON88913 (хлопчатник, устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-4854, описан в WO 04/072235 или US-A 2006-059590); объект MON88302 (масличный рапс, устойчивость к гербициду, депонирован под номером PTA-10955, описан в WO 2011/153186), объект MON88701 (хлопчатник, устойчивость к гербициду, депонирован под номером PTA-11754, описан в WO 2012/134808), объект MON89034 (кукуруза, борьба с насекомыми, депонирован под номером ATCC PTA-7455, описан в WO

07/140256 или US-A 2008-260932); объект MON89788 (соя, устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-6708, описан в US-A 2006-282915 или WO 06/130436); объект MS 11 (масличный рапс, контроль опыления - устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-850 или PTA-2485, описан в WO 01/031042); объект MS8 (масличный рапс, контроль опыления - устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-730, описан в WO 01/041558 или US-A 2003-188347); объект NK603 (кукуруза, устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-2478, описан в US-A 2007-292854); объект PE-7 (рис, борьба с насекомыми, не депонирован, описан в WO 08/114282); объект RF3 (масличный рапс, контроль опыления - устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-730, описан в WO 01/041558 или US-A 2003-188347); объект RT73 (масличный рапс, устойчивость к гербициду, не депонирован, описан в WO 02/036831 или US-A 2008-070260); объект SYHT0H2/SYN-000H2-5 (соя, устойчивость к гербициду, депонирован под номером PTA-11226, описан в WO 2012/082548), объект T227-1 (сахарная свекла, устойчивость к гербициду, не депонирован, описан в WO 02/44407 или US-A 2009-265817); объект T25 (кукуруза, устойчивость к гербициду, не депонирован, описан в US-A 2001-029014 или WO 01/051654); объект T304-40 (хлопчатник, борьба с насекомыми - устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-8171, описан в US-A 2010-077501 или WO 08/122406); объект T342-142 (хлопчатник, борьба с насекомыми, не депонирован, описан в WO 06/128568); объект TC1507 (кукуруза, борьба с насекомыми - устойчивость к гербициду, не депонирован, описан в US-A 2005-039226 или WO 04/099447); объект VIP1034 (кукуруза, борьба с насекомыми - устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-3925, описан в WO 03/052073), объект 32316 (кукуруза, борьба с насекомыми - устойчивость к гербициду, депонирован под номером PTA-11507, описан в WO 11/084632), объект 4114 (кукуруза, борьба с насекомыми - устойчивость к гербициду, депонирован под номером PTA-11506, описан в WO 11/084621), объект EE-GM3/FG72 (соя, устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-11041, WO 2011/063413A2), объект DAS-68416-4 (соя, устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-10442, WO 2011/066360A1), объект DAS-68416-4 (соя, устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-10442, WO 2011/066384A1), объект DP-040416-8 (кукуруза, борьба с насекомыми, депонирован под номером ATCC PTA-11508, WO 2011/075593A1), объект DP-043A47-3 (кукуруза, борьба с насекомыми, депонирован под номером ATCC PTA-11509, WO 2011/075595A1), объект DP-004114-3 (кукуруза, борьба с насекомыми, депонирован под номером ATCC PTA-11506, WO 2011/084621A1), объект DP-032316-8 (кукуруза, борьба с насекомыми, депонирован под номером ATCC PTA-11507, WO 2011/084632A1), объект MON-88302-9 (масличный рапс, устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-10955, WO 2011/153186A1), объект DAS-21606-3 (соя, устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-11028, WO 2012/033794A2), объект MON-87712-4 (соя, качественная характеристика, депонирован под номером ATCC PTA-10296, WO 2012/051199A2), объект DAS-44406-6 (соя, комбинированная устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-11336, WO 2012/075426A1), объект DAS-14536-7 (соя, комбинированная устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-11335, WO 2012/075429A1), объект SYN-000H2-5 (соя, устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-11226, WO 2012/082548A2), объект DP-061061-7 (масличный рапс, устойчивость к гербициду, регистрационный номер отсутствует, WO 2012071039A1), объект DP-073496-4 (масличный рапс, устойчивость к гербициду, регистрационный номер отсутствует, US2012131692), объект 8264.44.06.1 (соя, комбинированная устойчивость к гербициду, депонирован под номером PTA-11336, WO 2012075426A2), объект 8291.45.36.2 (соя, комбинированная устойчивость к гербициду, депонирован под номером PTA-11335, WO 2012075429A2), объект SYHT0H2 (соя, депонирован под номером ATCC PTA-11226, WO 2012/082548A2), объект MON88701 (хлопчатник, депонирован под номером ATCC PTA-11754, WO 2012/134808A1), объект KK179-2 (люцерна, депонирован под номером ATCC PTA-11833, WO 2013003558A1), объект pDAB8264.42.32.1 (соя, комбинированная устойчивость к гербициду, депонирован под номером ATCC PTA-11993, WO 2013010094A1), объект MZDT09Y (кукуруза, депонирован под номером ATCC PTA-13025, WO 2013012775A1).

Е. Полинуклеотидные конструкции

Полинуклеотиды, кодирующие полипептиды HPPD согласно настоящему изобретению, могут быть модифицированы, чтобы получить или усилить экспрессию в клетках растений. Полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, определенные в настоящей заявке, могут быть предложены в кассетах экспрессии для экспрессии в растении, представляющем интерес. "Кассета экспрессии в растениях" включает конструкцию ДНК, в том числе конструкцию рекомбинантной ДНК, которая способна обеспечить экспрессию полинуклеотида в клетке растения. Кассета может включать область инициации транскрипции, расположенную в 5'-3' направлении транскрипции (т.е. промотор, в частности гетерологичный промотор), функционально связанный с одним или более полинуклеотидами, представляющими интерес, и/или область терминирования трансляции и транскрипции (т.е., область терминирования), которая является функциональной в растениях. Указанная кассета может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный полинуклеотид для введения в организм, такой как селективируемый маркерный ген. Согласно другому варианту, дополнительный(ые) полинуклеотид(ы) может быть обеспечен на нескольких кассетах экспрессии. В настоящем изобретении предложена такая кассета экспрессии, содержащая множество сайтов

рестрикции для вставки полинуклеотида(ов), который будет находиться под транскрипционным контролем регуляторных областей.

В другом варианте реализации настоящее изобретение относится к химерному гену, содержащему кодирующую последовательность, которая содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению, функционально связанную с промотором, который способен экспрессироваться в растениях, и, возможно, область терминирования транскрипции и область полиаденилирования. Термин "гетерологичный" в целом относится к полинуклеотиду или полипептиду, который не является эндогенным для клетки или его расположение не является эндогенным для нативного генома, в котором он присутствует, и который был введен в клетку путем инфицирования, трансфекции, микроинъекции, электропорации, микропроекции и т.п. Термин "функционально связанный" подразумевает функциональную связь между двумя полинуклеотидами. Например, если промотор функционально связан с последовательностью ДНК, то последовательность промотора иницирует и опосредует транскрипцию последовательности ДНК. Известно, что функционально связанные полинуклеотиды могут быть смежными или несмежными и при использовании данного термина для обозначения соединения двух областей, кодирующих полипептиды, указанные полипептиды экспрессируются в одной и той же рамке считывания. Промотор может представлять собой любую полинуклеотидную последовательность, которая имеет транскрипционную активность в выбранных клетках растений, частях растений или растениях. Промотор может быть нативным или аналогичным либо чужеродным или гетерологичным для растения-хозяина и/или последовательности ДНК согласно настоящему изобретению. В том случае, когда промотор является "нативным" или "аналогичным" для растения-хозяина, предполагается, что промотор обнаруживается в нативном растении, в которое вводят промотор. В том случае, когда промотор является "чужеродным" или "гетерологичным" для последовательности ДНК согласно настоящему изобретению, предполагается, что промотор не является нативным или природным промотором для функционально связанной последовательности ДНК согласно настоящему изобретению. Промотор может быть конститутивным или индуцируемым. Промотор может быть природным, может состоять из частей различных природных промоторов или может быть частично или полностью синтетическим. Руководство по конструированию промоторов предоставлено на основании данных исследований структуры промоторов, таких как, например, Harley and Reynolds (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:2343-2361. Расположение промотора относительно сайта инициации транскрипции также может быть оптимизировано. См., например, Roberts et al. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:760-764. Многие промоторы, подходящие для применения в растениях, хорошо известны в данной области техники.

Например, конститутивные промоторы, подходящие для применения в растениях, включают: промоторы из вирусов растений, такие как промотор колимовируса полосатости и хлороза земляного ореха (PC1SV) (патент США №5850019); промотор 35S из вируса мозаики цветной капусты (CaMV) (Odell et al. (1985) *Nature* 313:810-812); промоторы генов метилтрансферазы вируса хлореллы (патент США №5563328) и полноразмерный транскрипционный промотор из вируса мозаики норичника (FMV) (патент США №5378619); промоторы из таких генов, как актин риса (McElroy et al. (1990) *Plant Cell* 2:163-171, и патент США №5641876); убиквитин (Christensen et al. (1989) *Plant Mol. Biol.* 12: 619-632 и Christensen et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689); pEMU (Last et al. (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81: 581-588); MAS (Velten et al. (1984) *EMBO J.* 3: 2723-2730, и патент США №5510474); гистона H3 кукурузы (Lepetit et al. (1992) *Mol. Gen. Genet.* 231: 276-285 и Atanassova et al. (1992) *Plant J.* 2(3): 291-300); ALS3 из *Brassica napus* (заявка на патент PCT WO 97/41228); промотор гена маленькой субъединицы рибулозобискарбонатазы/оксигеназы растений (RuBisCO); промотор из цирковруса (AU 689 311) или вируса мозаики маниока (Cassava vein mosaic virus) (CsVMV, US7053205); и промоторы из различных генов *Agrobacterium* (см. патенты США №№ 4771002; 5102796; 5182200 и 5428147).

Индукцируемые промоторы, подходящие для применения в растениях, включают: промотор системы ACE1, который реагирует на ионы меди (Mett et al. (1993) *PNAS* 90:4567-4571); промотор гена In2 кукурузы, который реагирует на антитела к гербициду бензолсульфонамиду (Hershey et al. (1991) *Mol. Gen. Genetics* 227: 229-237 и Gatz et al. (1994) *Mol. Gen. Genetics* 243:32-38); и промотор репрессора Tet из Tn10 (Gatz et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227:229-237). Другой индуцируемый промотор, подходящий для применения в растениях, представляет собой промотор, который реагирует на индуцирующий агент, на который растения не реагируют в обычных условиях. Типичный индуцируемый промотор этого типа представляет собой индуцируемый промотор из гена стероидного гормона, транскрипционная активность которого индуцируется глюкокортикоидным гормоном (Schena et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10421), или включает современное применение химерного активатора транскрипции, XVE, для использования в качестве индуцируемой системы экспрессии в растениях на основе рецептора эстрогенов, активируемой эстрадиолом (Zuo et al. (2000) *Plant J.*, 24:265-273). Другие индуцируемые промоторы для применения у растений описаны в EP332104, PCT WO 93/21334 и PCT WO 97/06269, которые полностью включены в настоящую заявку посредством ссылок. Также можно применять промоторы, состоящие из частей других промоторов, и частично или полностью синтетические промоторы. См., например, Ni et al. (1995) *Plant J.* 7:661-676 и PCT WO 95/14098, в которых описаны такие промоторы для применения в растениях.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения последовательность промотора, специфичная в отношении конкретных областей или тканей растений, может быть использована для экспрессии белков HPPD согласно настоящему изобретению, например промоторы, специфичные для семян (Datla R. et al., 1997, *Biotechnology Ann. Rev.* 3, 269-296), особенно промотор напина (EP 255378 A1), промотор фазеолина, промотор глютеина, промотор гелиантина (WO 92/17580), промотор альбумина (WO 98/45460), промотор олеозина (WO 98/45461), промотор SAT1 или промотор SAT3 (PCT/US98/06978).

Также можно применять индуцируемые промоторы, предпочтительно выбранные из фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А редуктазы (HMG), хитиназы, глюканазы, ингибитора протеиназы (PI), семейства генов PR1, нопалин-синтазы (NOS) и промоторов *vspB* (US 5670349, таблица 3), промотора HMG2 (США 5670349), промотора бета-галактозидазы (ABG1) яблони и промотора 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатсинтазы (ACC-синтазы) (WO 98/45445). Несколько промоторов могут быть использованы в конструкциях согласно настоящему изобретению, в том числе расположенных последовательно.

Промотор может включать или может быть модифицирован для включения одного или более энхансерных элементов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения промотор может включать множество энхансерных элементов. Промоторы, содержащие энхансерные элементы, обеспечивают более высокие уровни транскрипции по сравнению с промоторами, которые не содержат указанных элементов. Энхансерные элементы, подходящие для применения в растениях, включают энхансерный элемент PC1SV (патент США № 5850019), энхансерный элемент CaMV 35S (патенты США №№ 5106739 и 5164316), а также энхансерный элемент FMV (Maiti et al. (1997) *Transgenic Res.* 6:143-156); активатор трансляции вируса табачной мозаики (BTM), описанный в WO 87/07644, или вируса гравировки табака (TEV), описанный в работе Carrington & Freed 1990, *J. Virol.* 64: 1590-1597, например, или интроны, такие как интрон ADH1 кукурузы или интрон 1 актина риса. См. также PCT WO 96/23898, WO 2012/021794, WO 2012/021797, WO 2011/084370 и WO 2011/028914.

Часто такие конструкции могут содержать 5'- и 3'-нетранслируемые области. Такие конструкции могут содержать "сигнальную последовательность" или "лидерную последовательность" для облегчения ко-трансляционного и посттрансляционного транспорта пептида, представляющего интерес, к определенным внутриклеточным структурам, таким как хлоропласт (или другой пластид), эндоплазматическая сеть или аппарат Гольджи, или для секреции. Например, конструкция может быть модифицирована так, чтобы содержать сигнальный пептид для облегчения переноса пептида в эндоплазматическую сеть. Под термином "сигнальная последовательность" подразумевают последовательность, которая, как известно или как предполагается, приведет к котрансляционному или посттрансляционному транспорту пептида через клеточную мембрану. У эукариот этот процесс, как правило, включает секрецию в аппарат Гольджи с последующим гликозилированием. Под термином "лидерная последовательность" понимают любую последовательность, которая при трансляции обеспечивает аминокислотную последовательность, достаточную, чтобы инициировать ко-трансляционный транспорт пептидной цепи во внутриклеточную органеллу. Следовательно, такие последовательности включают лидерные последовательности, направляющие транспорт и/или гликозилирование путем переноса в эндоплазматическую сеть, переноса в вакуоли, пластыды, включая хлоропласты, митохондрии и т.п. Предпочтительной также может быть модификация кассеты экспрессии у растений для включения интрона так, чтобы для экспрессии требовалось расщепление мРНК интрона. Под термином "3'-нетранслируемая область" подразумевают полинуклеотид, расположенный после кодирующей последовательности. Сигнальные последовательности полиаденилирования и другие последовательности, кодирующие регуляторные сигналы, способные влиять на добавление участка полиадениловой кислоты к 3'-концу предшественника мРНК, представляют собой 3'-нетранслируемые области. Под термином "5'-нетранслируемая область" подразумевают полинуклеотид, расположенный перед кодирующей последовательностью.

Другие нетранслируемые элементы, расположенные перед или после кодирующей последовательности, включают энхансеры. Энхансеры представляют собой полинуклеотиды, функция которых заключается в усилении экспрессии промоторной области. Энхансеры хорошо известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются ими, энхансерную область SV40 и энхансерный элемент 35S. Область терминирования может быть нативной в отношении области инициации транскрипции, может быть нативной в отношении последовательности согласно настоящему изобретению, или может быть получена из другого источника. Подходящие области терминирования доступны из Ti-плазмиды *A. tumefaciens*, такие как области терминирования октопинсинтазы и нопалинсинтазы. См. также Guerineau et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262: 141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64:671-674; Sanfacon et al. (1991) *Genes Dev.* 5:141-149; Mogen et al. (1990) *Plant Cell* 2:1261-1272; Munroe et al. (1990) *Gene* 91: 151-158; Ballas et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 7891-7903; Joshi et al. (1987) *Nucleic Acid Res.* 15: 9627-9639; и европейскую заявку на патент EP 0633317 A1.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения синтетические последовательности ДНК конструируют для конкретного полипептида, такого как полипептиды согласно настоящему изобретению. Экспрессия открытой рамки считывания синтетической последовательности ДНК в клетке приводит к

выработке полипептида согласно настоящему изобретению. Синтетические последовательности ДНК могут быть пригодны для простого удаления нежелательных сайтов рестрикции эндонуклеазами, для облегчения стратегии клонирования ДНК, изменения или удаления любого возможного изменения частоты использования кодонов, изменения или увеличения содержания пар GC, удаления или изменения альтернативных рамок считывания, и/или изменения или удаления сайтов распознавания сплайсинга интронов/экзонов, сайтов полиаденилирования, последовательностей Шайна-Дельгарно, нежелательных промоторных элементов и т.п., которые могут присутствовать в нативной последовательности ДНК. Синтетические последовательности ДНК, возможно, могут быть использованы для введения других последовательностей ДНК для ее улучшения, таких как введение последовательности интрона, создание последовательности ДНК, которая экспрессируется в виде гибридного белка с последовательностями, направляющими указанный белок в органеллы, такими как транзитные пептиды для доставки в хлоропласта, пептиды, направляющие в апопласт/вакуоль, или пептидные последовательности, которые приводят к удержанию полученного пептида в эндоплазматической сети. Синтетические гены также могут быть синтезированы с использованием кодонов, которые являются предпочтительными для клеток-хозяев, чтобы улучшить экспрессию, или могут быть синтезированы с использованием кодонов с такой частотой применения кодонов, которая является предпочтительной для хозяина. См., например, Campbell and Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92: 1-11; патенты США №№6320100; 6075185; 5380831 и 5436391, публикации заявок на патент США №№ 20040005600 и 20010003849 и Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 477-498, которые включены в настоящую заявку посредством ссылок.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полинуклеотиды, представляющие интерес, направлены в хлоропласт для экспрессии. Таким образом, в том случае, если полинуклеотид, представляющий интерес, непосредственно не введен в хлоропласт, кассета экспрессии дополнительно содержит полинуклеотид, кодирующий транзитный пептид, чтобы направить нуклеотидную последовательность, представляющую интерес, в хлоропласта. Такие транзитные пептиды известны в данной области техники. См., 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.

Полинуклеотиды, представляющие интерес, которые должны быть направлены в хлоропласт, могут быть оптимизированы для экспрессии в хлоропласте, чтобы учесть различия в использовании кодонов между ядром растения и этой органеллой. Таким образом, полинуклеотиды, представляющие интерес, могут быть синтезированы с использованием кодонов, предпочтительных для хлоропласта. См., например, патент США № 5380831, который включен в настоящую заявку посредством ссылки. Указанная кассета экспрессии в растениях может быть вставлена в вектор трансформации растений. Под термином "вектор трансформации" подразумевают молекулу ДНК, которая обеспечивает трансформацию клетки. Такая молекула может состоять из одной или более кассет экспрессии, и может быть организована более чем в одной векторной молекуле ДНК. Например, бинарные векторы представляют собой векторы трансформации растений, которые используют два несмежных ДНК-вектора для кодирования всех необходимых цис- и транс-действующих функций для трансформации клеток растений (Hellens and Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5:446-451). Термин "вектор" относится к полинуклеотидной конструкции, предназначенной для переноса между различными клетками-хозяевами. Термин "вектор экспрессии" означает вектор, который обладает способностью включать, интегрировать и экспрессировать гетерологичные последовательности ДНК или их фрагменты в чужеродной клетке.

Вектор трансформации растений содержит один или более векторов ДНК для обеспечения трансформации растений. Например, стандартной методикой в данной области техники является использование векторов трансформации растений, которые содержат более одного непрерывного сегмента ДНК. В данной области техники такие векторы обычно называют бинарными векторами. Бинарные векторы, а также векторы, содержащие вспомогательные плазмиды, наиболее часто используются для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации, когда размер и сложность сегментов ДНК, необходимых для достижения эффективной трансформации, являются достаточно большими, и предпочтительным является распределение функций между отдельными молекулами ДНК. Бинарные векторы, как правило, содержат плазмидный вектор, содержащий цис-действующие последовательности, необходимые для переноса Т-ДНК (например, левый и правый пограничные районы), маркер для селекции, который модифицирован для придания ему способности экспрессироваться в клетке растения, и "полинуклеотид, представляющий интерес" (полинуклеотид, модифицированный для придания ему способности экспрессироваться в клетке растения, когда желательным является получение трансгенных растений, содержащих такой полипептид). На таком плазмидном векторе также присутствуют последовательности, необходимые для репликации в бактериальной клетке. Цис-действующие последовательности расположены таким образом, чтобы обеспечить эффективный перенос в клетки растения и экспрессию в них. Например, последовательность маркера для селекции и последовательность, представляющая интерес, расположены между левым и правым пограничными районами. Второй плазмидный вектор обычно содержит транс-действующие факторы, которые опосредуют перенос Т-ДНК из *Agrobacterium* в клетки растения. Такая плаزمида обычно обладает функциями вирулентности (гены Vir), которые обеспечивают инфицирование клеток растения

Agrobacterium и перенос ДНК путем отщепления пограничных последовательностей и *vir*-опосредованный перенос ДНК, известные в данной области техники (Hellens and Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science*, 5: 446-451) Несколько типов штаммов *Agrobacterium* (например, LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105 и т.д.) могут быть использованы для трансформации растений. Второй плазмидный вектор не является необходимым для введения полинуклеотидов в растения с помощью других способов, таких как микропроекция, микроинъекция, электропорация, применение полиэтиленгликоля и т.д.

Ф. Трансформация растений

Способы согласно настоящему изобретению включают введение нуклеотидной конструкции в растение. Под термином "введение" подразумевают способ представления нуклеотидной конструкции указанному растению таким образом, что конструкция получает доступ во внутреннее пространство клетки растения. Способы согласно настоящему изобретению не требуют использования конкретного способа введения нуклеотидной конструкции в растение, а только то, что нуклеотидная конструкция получает доступ во внутреннее пространство по меньшей мере одной клетки растения. Способы введения нуклеотидных конструкций в растения известны в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, способы стабильной трансформации, способы кратковременной трансформации и вирус-опосредованные способы. См., например, способы трансформации клеток растения и регенерации растений, описанные в: US 4459355, US 4536475, US 5464763, US 5177010, US 5187073, EP 267159 A1, EP 604662 A1, EP 672752 A1, US 4945050, US 5036006, US 5100792, US 5371014, US 5478744, US 5179022, US 5565346, US 5484956, US 5508468, US 5538877, US 5554798, US 5489520, US 5510318, US 5204253, US 5405765, EP 442174 A1, EP 486233 A1, EP 486234 A1, EP 539 563 A1, EP 674725 A1, WO 91/02071, WO 95/06128 и WO 2011/095460, каждый из которых полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки, в частности, в отношении способов трансформации, описанных в них.

В целом, способы трансформации растений включают перенос гетерологичной ДНК в клетки-мишени растения (например, незрелые или зрелые зародыши, суспензионные культуры, недифференцированный каллус, протопласты и т.д.), с последующим применением максимального порогового уровня агента для соответствующего способа отбора (в зависимости от маркерного гена для селекции), чтобы выделить трансформированные клетки растения из фракции нетрансформированной клеточной массы. Эксплантаты, как правило, переносят в свежий источник этой же среды и культивируют в соответствии со стандартными методиками. Трансформированные клетки затем дифференцируются в побеги после помещения их на среду для регенерации с добавлением максимального порогового уровня агента для отбора. Побеги затем переносят в селективную среду для укоренения, чтобы выделить имеющий корни побег или проросток. Трансгенный проросток затем выращивают до стадии зрелого растения и получают фертильные семена (например, Hiei et al. (1994) *The Plant Journal* 6: 271-282; Ishida et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 745-750). Эксплантаты, как правило, переносят в свежий источник этой же среды и культивируют в соответствии со стандартными методиками. Общее описание методик и способов получения трансгенных растений приведено в работах Ayres and Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13: 219-239 и Bommineni and Jauhar (1997) *Maydica* 42: 107-120. Поскольку трансформированный материал содержит много клеток, то в любой части каллуса-мишени или ткани, или группы клеток, подвергнутых трансформации, присутствуют как трансформированные, так и нетрансформированные клетки. Возможность вызывать гибель нетрансформированных клеток и обеспечивать пролиферацию трансформированных клеток приводит к получению трансформированных растительных культур. Возможность удаления нетрансформированных клеток обычно является ограничивающим фактором для быстрого выделения трансформированных растительных клеток и успешного получения трансгенных растений. Для того чтобы подтвердить присутствие интегрированного гетерологичного гена в геноме трансгенного растения могут быть использованы молекулярные и биохимические способы.

Создание трансгенных растений можно осуществлять с помощью одного из нескольких способов, включая, но не ограничиваясь ими, введение гетерологичной ДНК в клетки растения с помощью *Agrobacterium* (*Agrobacterium*-опосредованная трансформация), бомбардировка клеток растения гетерологичной чужеродной ДНК, прикрепленной к частицам, а также различных иных прямых способов без использования частиц (например, Hiei et al. (1994) *The Plant Journal* 6: 271-282; Ishida et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 745-750; Ayres and Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13: 219-239; Bommineni and Jauhar (1997) *Maydica* 42: 107-120) для переноса ДНК.

Способы трансформации хлоропластов хорошо известны в данной области техники. См., 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. Способ основан на доставке с помощью генной пушки частиц ДНК, содержащих маркер для селекции, и направлении ДНК в геном пластид с помощью гомологичной рекомбинации. Помимо этого трансформация пластид может быть достигнута путем трансактивации молчащего трансгена, полученного из пластид, путем экспрессии в предпочтительном типе ткани РНК-полимеразы, кодируемой в ядре и нацеленной на пластиды. Такая система была описана в работе McBride et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7301-7305.

Трансформированные клетки могут быть выращены в растения в соответствии со стандартными

способами. См., например, McCormick et al. (1986) *Plant Cell Reports* 5: 81-84. Такие растения затем могут быть выращены и опылены либо этим же трансформированным штаммом, либо другими штаммами, с последующей идентификацией полученного гибрида, имеющего конститутивную экспрессию желаемого фенотипического признака. Два или более поколений могут быть выращены, чтобы убедиться в том, что экспрессия желаемого фенотипического признака стабильно поддерживается и наследуется, после чего могут быть собраны семена, чтобы убедиться в том, что экспрессия желаемого фенотипического признака была достигнута. Таким образом, в настоящем изобретении предложены трансформированные семена (также называемые "трансгенные семена"), содержащие нуклеотидную конструкцию согласно настоящему изобретению, например кассету экспрессии согласно настоящему изобретению, стабильно встроенную в геном. Согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения семена могут быть покрыты по меньшей мере одним фунгицидом и/или по меньшей мере одним инсектицидом, по меньшей мере одним гербицидом, и/или по меньшей мере одним антидотом, или любой их комбинацией.

G. Оценка трансформации растений

После введения гетерологичной чужеродной ДНК в клетки растения трансформацию или интеграцию гетерологичного гена в геном растения подтверждают с помощью различных способов, таких как исследование нуклеиновых кислот, белков и метаболитов, связанных с интегрированным геном.

Исследование способом ПЦР является быстрым способом скрининга трансформированных клеток, тканей или побегов, чтобы выявить присутствие встроенного гена на более ранней стадии до высадки в грунт (Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)). ПНР проводят с использованием олигонуклеотидных праймеров, специфичных в отношении гена, представляющего интерес, или фенотипа вектора *Agrobacterium* и т.д.

Трансформация растений может быть подтверждена с помощью Саузерн-блота геномной ДНК (Sambrook and Russell (2001), выше). В целом, тотальную ДНК экстрагируют из трансформанта, расщепляют соответствующими рестриктазами, фракционируют в агарозном геле и переносят на нитроцеллюлозную или нейлоновую мембрану. Мембрану или "блот" затем можно исследовать, например, с использованием фрагмента ДНК-мишени, содержащего радиоактивную метку Р, чтобы подтвердить интеграцию введенного гена в геном растения в соответствии со стандартными методиками (Sambrook and Russell (2001), выше).

При использовании Нозерн-блота РНК выделяют из конкретных тканей трансформанта, фракционируют в агарозном геле, содержащем формальдегид, и переносят на нейлоновый фильтр в соответствии со стандартными методиками, которые обычно используются в данной области техники (Sambrook and Russell (2001), выше). Экспрессию РНК, кодируемой нуклеотидной последовательностью согласно настоящему изобретению, затем исследуют с помощью гибридизации на фильтре с радиоактивным зондом, полученным из GDC, с использованием способов, известных в данной области техники (Sambrook and Russell (2001), выше).

Исследования такими способами как Вестерн-блот, ИФА, исследование бокового потока и биохимические количественные исследования и т.п. могут быть проведены на трансгенных растениях, чтобы определить присутствие белка, кодируемого геном, придающим устойчивость к гербициду, с помощью стандартных процедур (Sambrook and Russell (2001), выше), используя антитела, которые связываются с одним или более эпитопов, присутствующих на белке, придающем устойчивость к гербициду. Согласно одному аспекту настоящего изобретения гены HPPD, описанные в настоящей заявке, можно применять в качестве маркеров для оценки трансформации бактериальных или клеток растения.

H. Способ применения в качестве маркера для оценки трансформации

Настоящее изобретение также относится к применению согласно способу трансформации растений, нуклеиновой кислоты, которая кодирует HPPD в соответствии с настоящим изобретением, в качестве маркерного гена или в качестве кодирующей последовательности, которая способна придать растению устойчивость к гербицидам, которые являются ингибиторами HPPD, а также к применению одного или более ингибиторов HPPD на растениях, содержащих последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую HPPD в соответствии с настоящим изобретением. См., например, патент США №6791014, который полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки. В данном варианте реализации настоящего изобретения ингибитор HPPD может быть введен в культуральную среду компетентных клеток растения таким образом, чтобы вызвать обесцвечивание указанных клеток перед этапом трансформации. Обесцвеченные компетентные клетки затем трансформируют геном, придающим устойчивость к ингибитору HPPD, в качестве маркера для селекции, и трансформированные клетки, которые интегрировали указанный маркер для селекции в их геном, приобретают зеленую окраску, что позволяет провести их отбор. Такой процесс позволяет уменьшить время, необходимое для отбора трансформированных клеток.

Следовательно, один вариант реализации настоящего изобретения включает способ трансформации клеток растения с помощью введения в указанные клетки растения гетерологичного гена, придающего устойчивость к ингибиторам HPPD, в качестве маркера для селекции, при этом указанный способ включает приготовление и культивирование компетентных клеток растения, способных получать гетерологичный ген, в подходящей среде, и введение соответствующего количества ингибитора HPPD в подходящую культуральную среду компетентных клеток растения. Компетентные клетки затем трансформи-

руют с использованием гетерологичного гена и маркера для селекции, и трансформированные клетки, содержащие гетерологичный ген, выращивают в подходящей среде с последующим отбором трансформантов из нее. Трансформированные клетки могут быть регенерированы в фертильные трансформированные растения.

I. Растения и части растений

Под термином "растение" подразумевают целые растения, органы растений (например, листья, стебли, корни и т.д.), семена, клетки растения, побеги, зародыши и их потомство. Клетки растения могут быть дифференцированными или недифференцированными (например, каллус, суспензионные культуры клеток, протопласты, клетки листьев, клетки корней, клетки флоэмы, пыльца). Настоящее изобретение можно применять для введения полинуклеотидов в любые виды растений, включая, но не ограничиваясь ими, однодольные и двудольные. Примеры растений, представляющих интерес, включают, но не ограничиваются ими, кукурузу (маис), сорго, пшеницу, подсолнечник, томат, крестоцветные, перцы, картофель, хлопчатник, рис, соевые бобы, сахарную свеклу, сахарный тростник, табак, ячмень и масличный рапс, виды рода *Brassica*, люцерну, рожь, просо, сафлор, арахис, сладкий картофель, маниоку, кофе, кокос, ананас, цитрусовые деревья, какао, чай, бананы, авокадо, инжир, гуаву, манго, оливы, папайю, кестью, макамию, миндаль, овес, овощи, декоративные и хвойные растения. Овощи включают, но не ограничиваются ими, томаты, салат, зеленые бобы, лимскую фасоль, горох и виды рода *Cucumis*, такие как огурцы, канталупа и мускусная дыня. Декоративные растения включают, но не ограничиваются ими, азалию, гортензию, гибискус, розы, тюльпаны, нарциссы, петунии, гвоздику, пуансеттию и хризантему. Сельскохозяйственные культуры также представляют интерес, включая, например, кукурузу, сорго, пшеницу, подсолнечник, томат, крестоцветные, перцы, картофель, хлопчатник, рис, соевые бобы, сахарную свеклу, сахарный тростник, табак, ячмень, масличный рапс и т.д.

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

J. Способы увеличения урожайности растений

В настоящем изобретении предложены способы увеличения урожайности растений. Способы включают обеспечение растения, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую HPPD согласно настоящему изобретению, или введение в растение или клетку растения, полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую HPPD согласно настоящему изобретению, выращивание указанного растения или его семени в поле, и получение урожая из указанных растений или семян. В настоящей заявке термин "урожайность" растения относится к качеству и/или количеству биомассы, продуцируемой указанным растением. Под термином "биомасса" подразумевают любой измеримый растительный продукт. Увеличение производства биомассы представляет собой любое улучшение урожайности измеряемой растительной продукции. Увеличение урожайности растений имеет несколько вариантов коммерческого применения. Например, увеличение биомассы листьев растений может увеличить урожайность листовых овощей для потребления человеком или животными. Помимо этого увеличение биомассы листьев можно использовать для увеличения производства фармацевтических или промышленных продуктов растительного происхождения. Увеличение урожайности может включать любое статистически достоверное увеличение, включая, но не ограничиваясь этим, увеличение по меньшей мере на 1%, увеличение по меньшей мере на 3%, увеличение по меньшей мере на 5%, увеличение по меньшей мере на 10%, увеличение по меньшей мере на 20%, увеличение по меньшей мере на 30%, увеличение по меньшей мере на 50%, увеличение по меньшей мере на 70%, увеличение по меньшей мере на 100% или более. В соответствии с конкретными способами реализации растение, содержащее последовательность HPPD согласно настоящему изобретению, обрабатывают эффективной концентрацией гербицида HPPD, такого как один или более гербицидов-ингибиторов HPPD, выбранных из группы, состоящей из гербицидов-ингибиторов HPPD, относящихся к классу N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамидов, N-(тетразол-4-ил)-или N-(триазол-3-ил)арилкарбоксамидов, таких как 2-хлор-3-этокси-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)бензамид и 2-хлор-3-(метоксиметил)-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)бензамид, к классу трикетонов, таких как темботрион, салкотрион и мезотрион, к классу изоксазолов, таких как изоксафлутол, или к классу пиразолинов, таких как пиразульфотол и топрамезон, в частности, выбранных из темботриона, салкотриона, топрамезона, бициклопирона, тефурилтриона, изоксафлутола и мезотриона, при этом применение гербицида приводит к увеличению урожайности растения.

В настоящем изобретении также предложены способы придания растению или части растения устойчивости к гербицидам. Согласно указанным способам нуклеотидную последовательность, кодирующую HPPD согласно настоящему изобретению, вводят в растение, при этом экспрессия указанного полинуклеотида придает устойчивость к гербицидам-ингибиторам HPPD. Растения, полученные с помощью этого способа, могут быть обработаны эффективной концентрацией гербицида (такого как один или более гербицидов-ингибиторов HPPD, выбранных из группы, состоящей из гербицидов-ингибиторов HPPD, относящихся к классу N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамидов, N-(тетразол-4-ил)-или N-(триазол-3-ил)арилкарбоксамидов, таких как 2-хлор-3-этокси-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)

ил)бензамид и 2-хлор-3-(метоксиметил)-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)бензамид, к классу трикетонов, таких как темботрион, салкотрион и мезотрион, к классу изоксазолов, таких как изоксафлутол, или к классу пиразолинов, таких как пиразульфотол и топрамезон, в частности, выбранных из темботриона, салкотриона, топрамезона, бициклопирона, тефурилтриона, изоксафлутола и мезотриона) и проявляют увеличенную устойчивость к указанному гербициду. В настоящей заявке термин "эффективная концентрация" гербицида относится к количеству, достаточному для того чтобы замедлить или остановить рост растений или частей растений, которые не являются устойчивыми в природных условиях или которым не была придана устойчивость к указанному гербициду.

К. Способы борьбы с сорными растениями в полевых условиях

Настоящее изобретение также относится к способу борьбы с нежелательными растениями или к регулированию роста растений в посевах растений, содержащих нуклеотидную последовательность, кодирующую HPPD в соответствии с настоящим изобретением, в том случае, когда один или более гербицидов-ингибиторов HPPD, например, один или более гербицидов-ингибиторов HPPD, выбранных из класса N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамидов, N-(тетразол-4-ил)- или N-(триазол-3-ил)арилкарбоксамидов, таких как 2-хлор-3-этокси-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)бензамид и 2-хлор-3-(метоксиметил)-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)бензамид, из класса трикетонов, таких как темботрион, салкотрион и мезотрион, из класса изоксазолов, таких как изоксафлутол, или из класса пиразолинов, таких как пиразульфотол и топрамезон, в частности, выбранных из темботриона, салкотриона, топрамезона, бициклопирона, тефурилтриона, изоксафлутола или мезотриона, наносят на растения (например, сорные растения, такие как однодольные или двудольные сорные растения или нежелательные сельскохозяйственные культуры), на семена (например, зерна, семена и вегетативные побеги, такие как клубни или части побегов с почками), или на области произрастания растений (например, обрабатываемая посевная площадь). Применительно к настоящему изобретению эффективную концентрацию одного или более гербицидов-ингибиторов HPPD, например, одного или более гербицидов-ингибиторов HPPD, выбранных из группы, состоящей из гербицидов-ингибиторов HPPD, относящихся к классу N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамидов, N-(тетразол-4-ил)- или N-(триазол-3-ил)арилкарбоксамидов, таких как 2-хлор-3-этокси-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)бензамид и 2-хлор-3-(метоксиметил)-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)бензамид, к классу трикетонов, таких как темботрион, салкотрион и мезотрион, к классу изоксазолов, таких как изоксафлутол, или к классу пиразолинов, таких как пиразульфотол и топрамезон, в частности, выбранных из темботриона, салкотриона, топрамезона, бициклопирона, тефурилтриона, изоксафлутола или мезотриона, можно применять, например, в качестве предпосевной обработки (при необходимости, также путем внесения в почву), довсходовой или послевсходовой обработки, и можно комбинировать с применением других гербицидов, к которым сельскохозяйственные культуры устойчивы в природных условиях, или к которым они устойчивы за счет экспрессии одного или более других трансгенов, придающих устойчивость к гербицидам. См., например, публикацию заявки на патент США 2004/0058427 и публикацию заявки на патент РСТ WO 98/20144. Под термином "эффективная концентрация" подразумевают концентрацию, которая контролирует рост или распространение сорных растений или других нетрансформированных растений, не оказывая при этом существенного влияния на растения или семена растений, устойчивых к ингибитору HPPD. Специалисты в данной области техники понимают, что применение гербицидов может быть осуществлено в различных формах, и может иметь место в различные периоды времени до и/или на протяжении посадки семян и процесса роста. Термин "довсходовое" применение относится к гербициду, который применяют на интересующей области (например, поле или обрабатываемая посевная площадь) до видимого появления растения из почвы. Термин "послевсходовое" применение относится к гербициду, который применяют на области после видимого появления растения из почвы. В некоторых случаях термины "довсходовый" и "послевсходовый" используются со ссылкой на сорное растение в области, представляющей интерес, и в некоторых случаях эти термины используются применительно к сельскохозяйственной культуре в области, представляющей интерес. При использовании со ссылкой на сорное растение, эти термины могут относиться к определенному типу сорного растения или виду сорного растения, который присутствует или предположительно присутствует в области, представляющей интерес. Термин "предпосевное внесение" гербицида предполагает внесение соединений в почву перед посевом.

Следовательно, настоящее изобретение относится к способу борьбы с сорными растениями в полевых условиях, включающему посев растения или его семян, содержащих HPPD согласно настоящему изобретению, в поле, и нанесение на указанное растение или область, окружающую указанное растение, эффективной концентрации одного или более гербицидов-ингибиторов HPPD.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения поле для посева растений (таких как растения сои, хлопчатника, кукурузы или пшеницы, например), содержащих нуклеотидную последовательность HPPD согласно настоящему изобретению, может быть обработано гербицидом-ингибитором HPPD, таким как изоксафлутол (IFT), до посева растений или высадки семян, что позволяет очистить поле от сорных растений, которые гибнут под действием ингибитора HPPD, обеспечивая тем самым нулевую обработку почвы, с последующим посевом или высадкой растений на этом же предварительно

обработанном поле (контактная обработка с использованием гербицида-ингибитора HPPD). Остаточная активность IFT также будет защищать всходящие и растущие растения от конкуренции со стороны сорных растений на ранних стадиях роста. После того, как растения достигнут определенного размера, и сорные растения, как правило, прорастут вновь, глифозинат или глифосат, или ингибитор HPPD, или смесь ингибитора HPPD с другим гербицидом, таким как глифосат, может быть применена в качестве послевсходового гербицида поверх растений, если такие растения устойчивы к указанным гербицидам.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения поле, на котором были высеяны семена, содержащие нуклеотидную последовательность HPPD согласно настоящему изобретению, может быть обработано гербицидом-ингибитором HPPD, таким как IFT, до всхода растений, но после посева семян (поле может быть избавлено от сорных растений перед посевом, используя другие средства, как правило, обычные способы обработки почвы, такие как вспашка, разрыхлительная вспашка или подготовка ложа для семян), при этом остаточная активность будет поддерживать поле без сорных растений, погибших под действием гербицида, так, что всходящие и растущие растения не конкурируют с сорными растениями (довсходовое применение гербицида-ингибитора HPPD). После того, как растения достигнут определенного размера, и сорные растения, как правило, прорастут вновь, глифозинат или глифосат, или ингибитор HPPD, или смесь ингибитора HPPD с другим гербицидом, таким как глифосат, можно применять в качестве послевсходового гербицида поверх растений, если такие растения устойчивы к указанным гербицидам.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения растения, содержащие нуклеотидную последовательность HPPD согласно настоящему изобретению, могут быть обработаны гербицидом-ингибитором HPPD поверх растений, взошедших из высаженных семян, который удаляет с поля сорные растения, погибшие под действием ингибитора HPPD, и который можно применять совместно (например, в составе смеси для распылительного устройства), после или до обработки глифосатом или глифозинатом, в качестве послевсходового гербицида поверх растений (послевсходовое применение гербицида-ингибитора HPPD (с или без глифосата)), если такие растения устойчивы к указанным гербицидам.

Примеры отдельных представителей однодольных и двудольных сорных растений, с которыми можно бороться, используя гербицид-ингибитор HPPD, включают: Однодольные сорные растения родов: *Aegilops*, *Agropyron*, *Agrostis*, *Alopecurus*, *Apera*, *Avena*, *Brachiaria*, *Bromus*, *Cenchrus*, *Commelina*, *Cynodon*, *Cyperus*, *Dactyloctenium*, *Digitaria*, *Echinochloa*, *Eleocharis*, *Eleusine*, *Eragrostis*, *Eriochloa*, *Festuca*, *Fimbristylis*, *Heteranthera*, *Imperata*, *Ischaemum*, *Leptochloa*, *Lolium*, *Monochoria*, *Panicum*, *Paspalum*, *Phalaris*, *Phleum*, *Poa*, *Rottboellia*, *Sagittaria*, *Scirpus*, *Setaria*, *Sorghum*. Двудольные сорные растения родов: *Abutilon*, *Amaranthus*, *Ambrosia*, *Anoda*, *Anthemis*, *Aphanes*, *Artemisia*, *Atriplex*, *Bellis*, *Bidens*, *Capsella*, *Carduus*, *Cassia*, *Centaurea*, *Chenopodium*, *Cirsium*, *Convolvulus*, *Datura*, *Desmodium*, *Emex*, *Erysimum*, *Euphorbia*, *Galeopsis*, *Galinsoga*, *Galium*, *Hibiscus*, *Ipomoea*, *Kochia*, *Lamium*, *Lepidium*, *Lindernia*, *Matricaria*, *Mentha*, *Mercurialis*, *Mullugo*, *Myosotis*, *Papaver*, *Pharbitis*, *Plantago*, *Polygonum*, *Portulaca*, *Ranunculus*, *Raphanus*, *Rorippa*, *Rotala*, *Rumex*, *Salsola*, *Senecio*, *Sesbania*, *Sida*, *Sinapis*, *Solanum*, *Sonchus*, *Sphenoclea*, *Stellaria*, *Taraxacum*, *Thlaspi*, *Trifolium*, *Urtica*, *Veronica*, *Viola*, *Xanthium*.

Гербициды-ингибиторы HPPD, подходящие для применения согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, гербициды-ингибиторы HPPD, относящиеся к классу N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамидов, N-(тетразол-4-ил)- или N-(триазол-3-ил)арилкарбоксамидов, такие как 2-хлор-3-этоксид-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)бензамид и 2-хлор-3-(метоксиметил)-4-(метилсульфонил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)бензамид, к классу трикетонов, такие как темботрион, салкотрион и мезотрион, к классу изоксазолов, такие как изоксафлутол, или к классу пиразолинов, такие как пиразульфотол и топрамезон, в частности, выбранные из темботриона, салкотриона, топрамезона, бициклопилона, тефурилтриона, изоксафлутола и мезотриона, и могут быть приготовлены различными способами, в зависимости от преобладающих биологических и/или физико-химических параметров. Примеры возможных составов включают смачиваемые порошки (WP), водорастворимые порошки (SP), водорастворимые концентраты, эмульгируемые концентраты (EC), эмульсии (EW), такие как эмульсии типа масло-в-воде и вода-в-масле, растворы для распыления, концентраты суспензий (SC), дисперсии на масляной основе или на водной основе, смешивающиеся с маслами растворы, капсулируемые суспензии (CS), тонкодисперсные порошки (DP), продукты для протравливания семян, гранулы для разбросного применения и нанесения на почву, гранулы (GR) в форме микрогранул, гранулы для распыления, покрытые гранулы и абсорбирующие гранулы, диспергируемые в воде гранулы (WG), водорастворимые гранулы (SG), ULV-составы, микрокапсулы и воски. Отдельные типы составов в принципе известны и описаны, например, в Winnacker-Kühler, "Chemische Technologie" [Chemical technology], volume 7, C. Hanser Verlag Munich, 4th Ed. 1986; Wade van Valkenburg, "Pesticide Formulations", Marcel Dekker, N.Y., 1973; K. Martens, "Spray Drying" Handbook, 3rd Ed. 1979, G. Goodwin Ltd. London. Необходимые вспомогательные добавки для составов, такие как инертные материалы, поверхностно-активные вещества, растворители и другие добавки, также известны и описаны, например, в: Watkins, "Handbook of Insecticide Dust Diluents and Carriers", 2nd Ed., Darland Books, Caldwell N.J., H.V. Olphen, "Introduction to Clay Colloid Chemistry", 2nd Ed., J. Wiley & Sons, N.Y.; C Marsden, "Solvents Guide", 2nd Ed., Interscience, N.Y. 1963; McCutcheon's "Detergents and Emulsifiers Annual", MC Publ. Corp., RidgeWO od N.J.; Sisley and WO od, "Encyclopedia of

Surface Active Agents", Chem. Publ. Co. Inc., N.Y. 1964; Schönfeldt, "Grenzflächenaktive Äthylenoxidaddukte" [Interface-active ethylene oxide adducts], Wiss. Verlagsgesell., Stuttgart 1976; Winnacker-Küchler, "Chemische Technologie" [Chemical technology], volume 7, C. Hanser Verlag Munich, 4th Ed. 1986.

На основе этих составов также можно приготовить комбинации с другими пестицидно-активными веществами, такими как, например, инсектициды, акарициды, гербициды, фунгициды, а также с антидотами, удобрениями и/или регуляторами роста, например, в виде готовой смеси или смеси в резервуаре.

L. Способы введения гена согласно настоящему изобретению в другое растение

В настоящем изобретении также предложены способы введения нуклеотидной последовательности HPPD согласно настоящему изобретению в другое растение.

Нуклеотидная последовательность HPPD согласно настоящему изобретению, или ее фрагмент, может быть введена во второе растение с помощью повторяющегося отбора, обратного скрещивания, селекционной работы, линейного отбора, массового отбора, мутационного отбора и/или отбора, улучшенного с помощью генетического маркера. Следовательно, в одном варианте реализации способы согласно настоящему изобретению включают скрещивание первого растения, содержащего нуклеотидную последовательность HPPD согласно настоящему изобретению, со вторым растением для получения потомства растений F1, и отбор потомства растений F1, устойчивого к гербициду-ингибитору HPPD или содержащего нуклеотидную последовательность HPPD согласно настоящему изобретению. Способы могут дополнительно включать скрещивание выбранного потомства растений с первым растением, содержащим нуклеотидную последовательность HPPD согласно настоящему изобретению, для получения потомства растений от обратного скрещивания, и отбор потомства растений от обратного скрещивания, которое устойчиво к гербициду-ингибитору HPPD или содержит нуклеотидную последовательность HPPD согласно настоящему изобретению. Способы оценки устойчивости к гербициду-ингибитору HPPD предложены в настоящей заявке в другом месте. Способы могут дополнительно включать повторное применение этих этапов один или несколько раз подряд, чтобы получить отобранное второе или далее потомство растений от обратного скрещивания, которое устойчиво к гербициду-ингибитору HPPD или содержит нуклеотидную последовательность HPPD согласно настоящему изобретению.

Любой способ селекции, включающий отбор растений для выявления желаемого фенотипа, может быть использован в соответствии со способом согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения растения F1 могут быть самоопыляемыми, чтобы получить расщепляющееся поколение F2. Могут быть отобраны отдельные растения, которые имеют желаемый фенотип (например, устойчивость к гербицидам-ингибиторам HPPD) в каждом поколении (F3, F4, F5 и т.д.), до тех пор, пока признак не станет гомозиготным или не закрепится в скрещиваемой популяции.

Второе растение может представлять собой растение, имеющее желаемый признак, например, устойчивость к гербициду, устойчивость к насекомым, засухоустойчивость, устойчивость к нематодам, эффективное использование воды, эффективное использование азота, улучшенную питательную ценность, устойчивость к заболеваниям, улучшенный фотосинтез, улучшенное качество волокон, устойчивость к стрессам, улучшенное воспроизведение и т.п. Второе растение может представлять собой элитный трансформант, описанный в настоящей заявке.

Согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения части растений (целые растения, органы растений (например, листья, стебли, корни и т.д.), семена, клетки растения, побеги, зародыши и т.п.) могут быть собраны из потомства, полученного от скрещивания, и размножены или собраны для дальнейшего использования (например, продукты питания, корм, биотопливо, масло, мука, пищевые продукты и т.д.).

M. Способы получения растительного продукта

Настоящее изобретение также относится к способу получения товарного продукта, включающему сбор и/или измельчение зерна из сельскохозяйственной культуры, содержащей последовательность HPPD согласно настоящему изобретению, для получения товарного продукта. Агрономически и экономически важные продукты и/или рассматриваемые композиции, включая, но не ограничиваясь ими, корма для животных, товарные продукты, а также растительные продукты и побочные продукты, предназначенные для использования в качестве продуктов питания для потребления человеком или для использования в композициях и товарных продуктах для потребления человеком, в частности нежизнеспособные продукты из семян/зерна, включая (полу)обработанные продукты, полученные из такого зерна/семян, где указанный продукт представляет собой или содержит целые или обработанные семена или зерна, корма для животных, кукурузные или соевые пищевые продукты, кукурузную или соевую муку, кукурузу, кукурузный крахмал, соевый шрот, соевую муку, хлопья, концентрат соевых белков, выделенные соевые белки, текстурированный концентрат соевых белков, косметические продукты, продукты по уходу за волосами, соевое ореховое масло, соевый сыр, темпе, гидролизированный соевый белок, взбитые сливки, кулинарный жир, лецитин, пищевые цельные соевые бобы (сырые, обжаренные или в виде бобов молочной спелости), соевый йогурт, соевый сыр, тофу, юбу, а также приготовленные, шлифованные, приготовленные на пару, запеченные или пропаренные зерна и т.п., включены в область настоящего изобретения, если указанные рассматриваемые продукты и композиции содержат детектируемые количества

нуклеотидной и/или аминокислотной последовательностей, приведенных в настоящей заявке, в качестве диагностического признака для любого растения, содержащего указанные нуклеотидные последовательности.

Приведенные далее примеры предложены в качестве иллюстративных, и не ограничивают объем настоящего изобретения.

Экспериментальная часть

Пример 1. Получение мутанта HPPD из *Pseudomonas fluorescens*, G336W (PfG336W) и кинетическая характеристика ферментов HPPD.

Нативную нуклеотидную последовательность HPPD из *Pseudomonas fluorescens* (PfHPPD, 1077 и.о., которая описана в WO 2009144079), кодирующую аминокислотную последовательность, приведенную в настоящей заявке в SEQ ID NO: 1 и описанную в WO 2009144079, WO 96/38567, а также в работе Rietschi et al. (Eur. J. Biochem., 205, 459-466, 1992), первоначально клонировали по уникальному сайту NcoI в вектор экспрессии pKK233-2 (Pharmacia), который обеспечивает стартовый кодон.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислоту аланин, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую N-концевую полигистидиновую метку (6x His, кодируемую: cat cac cat cac cat cac (SEQ ID NO:77), вставляли на 5'-конце непосредственно после кодона ATG. Пары оснований, кодирующие два дополнительных остатка цистеина, добавляли перед кодоном ATG, чтобы получить последовательность, соответствующую сайту распознавания рестриктазой NcoI, и последовательности, соответствующие сайту распознавания рестриктазой XbaI, добавляли после стоп-кодона. Последовательность ДНК, соответствующую гену, включая последовательность, кодирующую His-метку, вырезали с использованием рестриктаз NcoI и XbaI и затем клонировали в модифицированный вектор экспрессии pSE420(RI)NX (5261 п.о.). Вектор для клонирования и экспрессии pSE420(RI)NX (5261 п.о.) основан на плазмиде pSE420 от Invitrogen (Карлсруэ, Германия). Модификации этого вектора включают добавление гена *prtII* (неомицинфосфотрансфераза; Sambrook and Russell, 2001, Молекулярное клонирование: лабораторное руководство, (третье издание)), придающего устойчивость к антибиотику канамицину, и отсутствие большей части суперлинкерной области (сайт множественного клонирования).

Плазмида содержит промотор *trp-lac* (*trc*) и ген *lacI^q*, который обеспечивает присутствие Лас-репрессора в каждом штамме-хозяине *E. coli*. Лас-репрессор связывается с Лас-оператором (*lacO*) и ограничивает экспрессию гена-мишени; такое ингибирование может быть уменьшено с помощью индукции изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (IPTG). Полученный вектор назвали pSE420(RI)NX-PfHPPD и использовали для трансформации клеток *Escherichia coli* BL21 (Merck, Дармштадт, Германия).

Плазмиду pSE420(RI)NX-PfHPPD подвергали ПЦР-опосредованному сайт-направленному мутагенезу, чтобы изменить определенный кодон в соответствующих сайтах гена PfHPPD. Кодон, кодирующий глицин (G) в положении 336, замещали кодоном, кодирующим триптофан (W). Полученный мутант назвали PfG336W, и полученный вектор pSE420(RI)NX-PfG336W.

Экспрессию HPPD осуществляли в клетках *E. coli* K-12 BL21, содержащих pSE420(RI)NX-PfHPPD или pSE420(RI)NX-PfG336W. Клетки культивировали до достижения величины оптической плотности (OD) равной 0,5, после чего экспрессию, регулируемую промотором *trp-lac* (*trc*), инициировали путем внесения 1 mM IPTG, который связывается с *lac*-репрессором и вызывает его диссоциацию от *lac*-оперона. Экспрессию осуществляли в течение 15 ч при 28°C.

Для получения предварительной стартовой культуры в 2 мл среды TB (100 мкг·мл⁻¹ карбенициллина) инокулировали 50 мкл исходного раствора глицерина, содержащего штамм *E. coli* K-12 BL21. Предварительную стартовую культуру инкубировали при 37°C и встряхивании при 140 оборотах в минуту в течение 15 ч. 200 мкл предварительной стартовой культуры использовали для инициирования стартовой культуры (5 мл TB с добавлением 100 мкг·мл⁻¹ карбенициллина), которую инкубировали 3 ч при 37°C.

Для получения основной культуры в 400 мл среды TB (100 мкг·мл⁻¹ карбенициллина) инокулировали 4 мл стартовой культуры. Данную стартовую культуру инкубировали при 37°C и встряхивании при 140 оборотах в минуту до достижения величины OD₆₀₀ равной 0,5. Затем индуцировали экспрессию рекомбинантного белка путем внесения 400 мкл 1 M раствора IPTG. Клетки культивировали в течение еще одного часа при этих же условиях, затем температуру понижали до 28°C и культуры встряхивали при 140 оборотах в минуту в течение 15 ч. Клетки собирали с помощью центрифугирования при 6000×g в течение 15 мин при 4°C. Клеточную массу затем хранили при -80°C.

Выделение и очистка His6-PfHPPD и His6-PfG336W в нативной форме

Лизис клеток

Клетки лизировали с помощью лизоцима, фермента, который расщепляет 1,4-β-связи между N-ацетилмурамовой кислотой и остатками N-ацетил-D-глюкозамина в пептидогликане, образующем клеточную стенку бактерий. Внутреннее давление в бактериальной клетке приводило к разрушению клеточных мембран. Помимо этого лизирующий буфер содержал нуклеазу BENZONASE®, эндонуклеазу, которая гидролизует все формы ДНК и РНК, не повреждая белки, и тем самым в значительной степени снижает вязкость клеточного лизата. Лизис в нативных условиях проводили на льду.

Для очистки His₆-меченых белков использовали набор QIAEXPRESS® Ni-NTA Fast Start Kit в соот-

ветствии с инструкцией в руководстве пользователя.

Очистка His₆-меченых белков способом аффинной хроматографии с использованием иммобилизованных ионов металлов (IMAC)

Очищенный клеточный лизат (10 мл), полученный после центрифугирования продуктов реакции лизиса, наносили на колонку Ni-NTA Fast Start из набора QIAEXPRESS® Ni-NTA Fast Start Kit (Qiagen, Хилден, Германия), и очистку осуществляли в соответствии с руководством пользователя. His₆-меченый белок элюировали с использованием 2,5 мл буфера для элюции.

Обессоливание растворов HPPD способом гель-фильтрации

Растворы HPPD, элюированные из колонки Ni-NTA Fast Start с использованием 2,5 мл буфера для элюции, наносили на колонку Sephadex G-25 PD-10 (GE Healthcare, Фрейбург, Германия) в соответствии с инструкцией в руководстве пользователя. После того как весь образец проник в слой геля, элюирование выполняли с использованием 3,5 мл буфера для хранения.

Растворы HPPD, элюированные из колонки для обессоливания, замораживали при -80°C в виде аликвот объемом 1 мл.

Определение концентрации белка HPPD с использованием количественного исследования белка по способу Брэдфорд

Концентрацию белка определяли с использованием стандартного количественного исследования белка по способу Брэдфорд (Bradford, (1976), Anal Biochem 72: 248-254). Определение чистоты растворов HPPD с использованием электрофореза в ДСН-ПААГ. Целостность элюированного белка проверяли с помощью гель-электрофореза белка в ДСН-ПААГ с использованием 4-12% бис-трис гелей NUPAGE® Novex (Invitrogen, Карлсруэ, Германия), и при этом наносили приблизительно 10 мкг белка. Десять мкл буфера для образца в модификации Леммли (Laemmli) добавляли к 1-10 мкл раствора белка, и смесь инкубировали при 90°C в течение 10 мин. После короткого этапа центрифугирования всю смесь наносили на дорожку ДСН-содержащего геля, предварительно закрепленного в мини-камере для гелей XCELL SURELOCK™ Novex, заполненной подвижным буфером NUPAGE® MOPS SDS (разбавленным ddH₂O из 20-кратного раствора). Затем к камере для гелей применяли напряжение 150 мВ в течение 1 ч. Для окрашивания полос (бендов) белка, гель погружали в красящий раствор Кумасси Бриллиантовый синий R-250. Для обесцвечивания полиакриламидного геля его погружали в раствор для обесцвечивания Кумасси Бриллиантовый синий R-250 до появления синих полос белка на прозрачном геле.

Пример 2. Кинетическая характеристика и оценка устойчивости к ингибиторам HPPD ферментов HPPD, PfHPPD и PfG336W

Активность HPPD проверяли с помощью стандартного спектрофотометрического количественного исследования (описанного в WO 2009/144079, который полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки).

Определение кинетических свойств HPPD в условиях *in vitro*

Значения K_m , V_{max} и k_{cat} для различных препаратов ферментов HPPD и IQ, $K_i=K_{on}$, и $K_{-i}=K_{off}$ для различных ингибиторов HPPD определяли или могут быть определены с помощью способа ВЭЖХ для измерений активности HPPD. Смеси для количественных исследований содержали в объеме 1 мл: 150 mM буфера Трис-HCl, pH=7,8, 10 mM аскорбата натрия, 650 единиц бычьей каталазы (Sigma C30 (Sigma-Aldrich, Мюнхен, Германия), 34 мг белка/мл, 23000 единиц/мг) и соответствующие количества HPP, очищенного фермента HPPD и ингибиторов HPPD. Для определения значений K_m , V_{max} и k_{cat} концентрации HPP в смеси для количественного исследования варьировали от 10 до 400 мкМ. Для определения значений IQ, $K_i=K_{on}$ и $K_{-i}=K_{off}$ использовали или может быть использовано 2 mM HPP. Все исследования начинали путем добавления фермента HPPD к смеси для количественного исследования и останавливали в промежутках времени от 0 до 240 с путем добавления 200 мкл реакционной смеси к реакционным пробиркам, содержащим 20 мкл 10% хлорной кислоты. Преципитированный белок осаждали путем 5-минутного центрифугирования при 10000 g. 100 мкл супернатанта наносили на колонку Eurospher 100-5 C18 250x4 мм Knauer (Берлин, Германия), уравновешенную с использованием 10% метанола, 0,1% трифторуксусной кислоты (буфер А). Содержимое колонки элюировали, при скорости потока 1,5 мл/мин, с использованием 4-минутной промывки буфером А, а затем 3-минутной промывки 95% метанолом и еще одной 2-минутной промывки буфером А. Элюирование HGA (гомогентизиновой кислоты) и HPP (гидроксифенилпирувата) контролировали при длине волны 292 нм. HGA элюировали в течение приблизительно 5 мин и HPP элюировали позднее. Стандартный набор концентраций HGA использовали, чтобы получить стандартную кривую для калибровки зависимости величины поглощения при 292 нм пика HGA от концентрации HGA. Для определения значений K_m и V_{max} начальные скорости реакции HPPD при различных концентрациях субстрата определяли на основании графиков образования HGA в зависимости от времени и аппроксимированных с использованием уравнения Михаэлиса-Ментен для одностратных ферментов с помощью пакета программного обеспечения XLfit от ID Business Solutions Ltd. (www.idbs.com). Для определения значений K_i , $K_i=K_{on}$ и $K_{-i}=K_{off}$ временные зависимости реакции HPPD при различных концентрациях ингибитора аппроксимировали с использованием уравнений для механизма А, конкурентного ингибирования, для прочно связывающихся ингибиторов (Cha, S. (1975) Tight-

bindinginhibitors - I. Kinetic behaviour. Biochemical Pharmacology 24, 2177-2185) с использованием пакета программного обеспечения XLfit от ID Business Solutions Ltd.

Таблица 1. Кинетическая характеристика ферментов HPPD (PfHPPD и PfG336W).

В приведенной ниже табл. 1 " K_m " (константа Михаэлиса-Ментен) означает кинетический параметр, который используется, чтобы охарактеризовать фермент, и определяется как концентрация субстрата, которая обеспечивает полумаксимальную скорость реакции. K_m также определяется как концентрация субстрата, при которой скорость реакции достигает половины своего максимального значения ($V_{max}/2$), где V_{max} представляет собой максимальную скорость реакции.

$K_{on}=K_1$ приравнивает константу скорости ассоциации связывания фермента с субстратом и $K_{off}=K_{-1}$ приравнивает константу скорости диссоциации комплекса фермент-ингибитор. K_1 определяет константу ингибирования. Для определения удельной активности ферментов образцы инкубировали, и реакцию останавливали через 24 мин. Удельную активность оценивали в пересчете на мкг белка.

Таблица 1

	HPP	HPP	Удельная активность
	K_m (мкМ)	K_{cat} (s^{-1})	$\Delta E/24$ мин/мкг белка
PfHPPD	187	4,4	0,76
PfG336W	141	5,4	0,40

Табл. 1 показывает, что кинетические параметры K_m и K_{cat} бактериального HPPD дикого типа (PfHPPD) и мутантного HPPD (PfG336W) не имеют достоверных различий. Тем не менее, удельная активность мутантного белка значительно снижается по сравнению с таковой для белка дикого типа.

Определение активности HPPD в присутствии нескольких ингибиторов HPPD

Применительно к этому исследованию величина pI_{50} относится к значению логарифма концентрации ингибитора, необходимой для ингибирования на 50% активности фермента в молярной концентрации.

Значения pI_{50} для ингибиторов HPPD определяли на основании графиков отношения "доза-ответ" активности HPPD в зависимости от концентрации ингибитора, используя количественное исследование, подробно описанное в WO 2009/144079, при фиксированной концентрации HPP 2 мМ и фиксированном времени инкубации 3 мин, используя пакет программного обеспечения XLfit ID Business Solutions Ltd.

Значения pI_{50} для ферментов PfHPPD и PfG336W измеряли с помощью спектрофотометрического способа. Измеряли устойчивость к нескольким ингибиторам HPPD, перечисленным далее, темботрион, дикетонитрил, мезотрион. Символ ">" означает, что значение было намного выше, чем указанное значение, но не могло быть точно вычислено в пределах концентрации исследованного ингибитора ($5,0 \times 10^{-5}$, $1,0 \times 10^{-5}$, $2,5 \times 10^{-5}$, $4,0 \times 10^{-5}$, $7,0 \times 10^{-5}$, $1,0 \times 10^{-4}$, $2,0 \times 10^{-4}$ и $5,0 \times 10^{-4}$ М). В этом эксперименте значения считывали через 24 мин после начала эксперимента. Полученные результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2

	Темботрион	Дикетонитрил	Мезотрион
PfHPPD	>5,6	>5,6	>5,6
PfG336W	>5,6	4,9	5,3

Значения pI_{50} ферментов HPPD также измеряли с помощью способа ВЭЖХ. Измеряли устойчивость к ингибиторам HPPD: темботриону, дикетонитрилу и мезотриону. В этом эксперименте измерение осуществляют через 3 мин после начала эксперимента. Полученные результаты приведены в табл. 3.

Таблица 3

	Темботрион	Дикетонитрил	Мезотрион
PfHPPD	4,9	4,7	4,7
PfG336W	4,6	4,2	4,3

В качестве альтернативного способа измерения активности HPPD и устойчивости HPPD к ингибиторам HPPD активность HPPD измеряли при комнатной температуре путем добавления соответствующих количеств HPPD к раствору, содержащему 200 мМ Трис-HCl, pH=7,6, 10 мМ аскорбата, 20 мкМ $FeSO_4$, 650 единиц каталазы, 8 мкг диоксигеназы HGA (HGA:гомогентисат) и 10-100 мкМ HPP в общем объеме 1 мл. Начальные скорости реакции определяли по увеличению поглощения при длине волны 318 нм в результате образования малеилацетоацетата ($\epsilon_{318} = 11900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Значения K_m и V_{max} определяли путем аппроксимации начальных скоростей метаболизма HPP, измеренных при различных концентрациях HPP, с помощью уравнения Михаэлиса-Ментен с использованием модели 350 пакета программного обеспечения XLfit, версия 5.1.0.0, ID Business Solutions Ltd. Этот способ назван количественное исследование HGD. В исследовании с соотношением активности HPPD с развитием окраски (HGD; PfHPPD и PfG336W) также измеряли значения pI_{50} ферментов HPPD и их соответствующую устойчивость к ингиби-

торам HPPD: темботриону, дикетонитрилу и мезотриону. Результаты приведены в табл. 4.

Таблица 4

	Темботрион	Дикетонитрил	Мезотрион
PfHPPD	6,4	5,8	5,8
PfG336W	6,0	5,3	5,3

Из данных в табл. 2, 3 и 4 с очевидностью следует, что мутация в положении 336 HPPD из *Pseudomonas fluorescens* значительно увеличивала устойчивость HPPD к нескольким ингибиторам HPPD.

Пример 3. Библиотека точечных мутаций первого поколения.

Мутант PfG336W подвергали дальнейшему мутагенезу по 16 положениям. Рандомизацию этих положений осуществляли с использованием набора для быстрого сайт-направленного мутагенеза QUIK-CHANGE®. Теоретическое разнообразие библиотеки составило приблизительно 300. Мутантов объединяли и трансформировали ими клетки DH5alpha *E. coli*. Шестьсот индивидуальных клонов подвергали скринингу для определения устойчивости к ингибитору HPPD, темботриону (TBT). Клоны выращивали в среде LB с добавлением канамицина при 37°C в шейкере до достижения OD600 равной 0,3. Температуру инкубации культур затем понижали до 30°C и инкубировали в течение дополнительных 17 ч. Культуры центрифугировали, и клеточную массу ресуспендировали в 10 mM HEPES/КОН, pH=7,6, 4 mM MgCl₂, 1 mM DTT. Клетки лизировали путем размалывания с гранулами, и после центрифугирования получали растворимые клеточные экстракты.

Мутантов исследовали с использованием теста развития коричневой окраски. В частности, экстракты HPPD исследовали в 96-луночном формате для определения устойчивости к ингибитору HPPD путем точечного нанесения на плотные среды, содержащие LB-агар, канамицин, 5 mM тирозина, 42 mM сукцината и ингибитор HPPD. При первичном скрининге 20 мкл экстракта точно наносили в трех повторях на планшеты, содержащие 250 мкМ темботриона. Планшеты покрывали воздухопроницаемой лентой и инкубировали при 37°C. Через 24 ч образование коричневого пигмента визуально сравнивали с образцом, содержащим PfG336W. Варианты с увеличенным образованием пигмента в присутствии TBT повторно исследовали в присутствии 250 мкМ TBT и 250 мкМ активного соединения дикетонитрила (DKN), изоксафлутола (IFT). Варианты, которые вновь проявили улучшенную устойчивость к ингибитору, повторно экспрессировали, и экстракт титровали в присутствии 250 мкМ TBT и 250 мкМ DKN, чтобы определить степень улучшения. Образцы экстракта исследовали с помощью способа электрофореза в ДСН-ПААГ, и было обнаружено, что экстракты содержат равные количества белка HPPD. Титрование выявило, что вариант PfHPPDEvo33 (SEQ ID NO:6) имеет в четыре раза более устойчив к TBT и DKN по сравнению с PfG336W. Этот вариант содержал замену пролина на глутаминовую кислоту в положении 335 относительно PfG336W. Эта мутация расположена на С-концевой альфа-спирали, которая играет роль ворот перед активным сайтом.

Пример 4. Скрининг перестановочной (пермутационной) библиотеки второго поколения

Были исследованы последовательности наиболее эффективных вариантов первого поколения, и была получена перестановочная библиотека второго поколения в области, комбинирующей положения 335, 336, 339 и 340. Теоретическое разнообразие этой библиотеки составило 640. Скрининг осуществляли, как описано в примере 3. Другую перестановочную библиотеку второго поколения получали путем направленного воздействия на положения 188, 189 и 190, и оценивали с использованием теста развития коричневой окраски.

Данные титрования показали, что вариант PfHPPDEvo36 (SEQ ID NO:7) имел увеличенную в 16 раз устойчивость к TBT и DKN по сравнению с PfG336W. Он имеет увеличенную в 4 раза устойчивость по сравнению с PfHPPDEvo33. Экспрессию белка повторно исследовали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ, и было обнаружено, что варианты экспрессируют равные количества белка HPPD. PfHPPDEvo36 содержит замену серина на глутаминовую кислоту в положении 335, серина на триптофан в положении 336, треонина на лизин в положении 339 и глутамин на аланин в положении 340 по сравнению с PfG336W.

Данные титрования показали, что вариант PfHPPDEvo37 (SEQ ID NO:3) имел увеличенную устойчивость к TBT и DKN по сравнению с PfG336W. PfHPPDEvo37 содержит замену триптофана на аланин в положении 188 по сравнению с PfG336W. Было проведено исследование с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ, которое не выявило различий в уровнях экспрессии HPPD между вариантами.

Данные титрования, приведенные ниже, показывают, что вариант PfHPPDEvo40 (SEQ ID NO:8) имел увеличенную устойчивость к TBT и DKN по сравнению с PfG336W. Было проведено исследование с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ, которое не выявило различий в уровнях экспрессии HPPD между вариантами.

Варианты также исследовали путем посева интактных клеток *E. coli*, экспрессирующих HPPD, на среды, содержащие различные ингибиторы HPPD. Для этих экспериментов клетки DH5alpha, содержащие плазмиду, экспрессирующую HPPD, выращивали в среде LB с канамицином до достижения OD₆₀₀ равной 0,5. Серийные разведения клеток готовили в среде LB с канамицином, соответствующие значени-

ям OD₆₀₀ равным 0,016, 0,008, 0,004 и 0,002. По 10 мкл каждого разведения высевали в трех повторах на планшеты, не содержащие ингибитора HPPD, содержащие 250 мкМ TBT, 250 мкМ DKN и 250 мкМ мезотриона (MST). Планшеты инкубировали в течение 18 ч при 37°C. Было проведено исследование способом электрофореза в ДСН-ПААГ, которое не выявило различий в уровнях экспрессии HPPD между вариантами.

В этом исследовании PfHPPDEvo40 и PfHPPDEvo41 (SEQ ID NO:16) показали улучшенную устойчивость к TBT и MST по сравнению с PfG336W.

Пример 5. Ферментативное исследование перестановочных мутантов

Кинетическую активность фермента PfHPPD сравнивали с таковой для нескольких из перестановочных мутантов, и результаты представлены в табл. 5 ниже. " K_m " (константа Михаэлиса-Ментен) обозначает кинетический параметр, который используется для характеристики фермента, и определяется как концентрация субстрата, которая обеспечивает полумаксимальную скорость реакции. K_m также определяется как концентрация субстрата, при которой скорость реакции достигает половины своего максимального значения ($V_{max}/2$), где значение V_{max} представляет собой максимальную скорость реакции.

Для определения удельной активности ферментов образцы инкубировали, и реакцию останавливали через 24 мин. Удельную активность оценивали в расчете на мкг белка.

Таблица 5

	HPP	HPP	SEQ ID NO:
	K_m (мкМ)	K_{cat} (с ⁻¹)	
PfHPPD	187	4,4	1
PfG336W	141	5,4	2
PfHPPDEvo37	220	3,0	3
CO23E6	424	6,9	4
CO24H11	188	0,8	5
PfHPPDEvo33	581	2,3	6
PfHPPDEvo36	602	3,3	7
PfHPPDEvo40	509	3,2	8
CO210d10	1181	1,4	9
CO212f3	297	0,9	10
C644	232	0,5	11
C645	156	0,8	12
c0216C6	1541	1,2	14
c0213H10	489	2,6	15
PfHPPDEvo41	336	1,1	16

Величины удельной активности HPPD из HPPD *Pseudomonas fluorescens* (PfHPPD) и его мутантов получали с использованием спектрофотометрического способа. Образцы инкубировали, и реакцию останавливали через 24 мин. Удельную активность оценивали в пересчете на мкг белка.

Таблица 6

HPPD	Удельная активность (Дпоглощения/24 мин/мкг белка)	SEQ ID NO:
PfHPPD	0,76	1
PfG336W	0,4	2
PfHPPDEvo37	0,36	3
C023E6	0,38	4
C024H11	0,07	5
PfHPPDEvo33	0,25	6
PfHPPDEvo36	0,82	7
PfHPPDEvo40	0,42	8
C0210d10	0,43	9
C0212f3	0,42	10
C644	0,38	11
C645	0,36	12
c0218A5	0,13	13
c0216C6	0,50	14
c0213H10	0,51	15
PfHPPDEvo41	0,44	16
C0228G9	0,17	17
C0232D2	0,06	18
C0234A4	0,33	19
C0235F6	0,53	20
C0235E2	0,34	21
C0236H7	0,36	22
C0236F8	0,47	23
C0240D2	0,32	24
C0240D12	0,29	25
C0242D4	0,21	26
C0244A2	0,25	27
C0244F5	0,22	28
C0247B6	0,37	29
C0247H7	0,28	30
C0252F11	0,26	31
C0255B12	0,21	32
C0255C1	0,17	33
C0255C3	0,19	34
C0255E6	0,15	35
C0255E10	0,24	36
C0256B1	0,31	37
C0256G11	0,33	38
C0256H4	0,19	39
C0257C5	0,3	40
C0260E11	0,79	41
C0260C6	0,51	42
C0262C4	0,81	43
C0262F11	0,76	44
C0263B7	0,43	45
C0263G12	0,77	46
C0261H2	0,42	47
C0264G5	0,71	48
C0264G7	0,35	49
C0266A11	0,33	50

Как показано в табл. 6, отсутствовало достоверное различие величин активности между формами дикого типа и большинством мутантных форм фермента. Таким образом, вероятно, наблюдаемая устойчивость обусловлена внутренними свойствами фермента, а не дисфункцией или более низкой активностью превращения 4-гидроксифенилпирувата в гомогентисат.

Устойчивость к темботриону, дикетонитрилу (активная форма изоксафлутола) и мезотриону также

измеряли с использованием спектрофотометрического способа. Значения представляют собой PI_{50} . Знак ">" означает, что значение выходило за пределы диапазона измерения в данном исследовании (например, что значение чувствительности фермента больше, чем указанное далее значение).

Таблица 7

HPPD	PI_{50} дикетонитрила	PI_{50} мезотриона
	OD	OD
RfHPPD	>5,6	>5,6
PfG336W	4,9	5,3
RfHPPDEvo37	4,7	5,3
C023E6	4,4	5,5
C024H11	4,1	4,6
RfHPPDEvo33	4,3	5,1
RfHPPDEvo36	4,5	H.o.
RfHPPDEvo40	3,5	4,9
C0210d10	4,3	5,7
C0212f3	4,7	5,4
C644	5,3	>5,6
C645	>5,6	>5,6
c0218A5	4,4	5,1
c0216C6	4,0	4,9
c0213H10	4,9	5,2
RfHPPDEvo41	3,4	4,7
C0228G9	5,4	5,7
C0232D2	5,1	5,5
C0234A4	4,9	>5,6
C0235F6	4,7	5,5
C0235E2	4,7	5,4
C0236H7	4,7	5,3
C0236F8	4,9	>5,6
C0240D2	4,9	5,4
C0240D12	4,5	5,0
C0242D4	3,6	4,5
C0244A2	4,7	5,6
C0244F5	4,3	5,3
C0247B6	5,1	>5,6
C0247H7	4,4	5,2
C0252F11	3,7	4,6
C0255B12	4,0	5,0
C0255C1	3,6	4,7
C0255C3	4,8	5,5
C0255E6	3,7	4,4
C0255E10	4,8	>5,6
C0256B1	5,0	>5,6
C0256G11	4,9	5,5
C0256H4	3,6	4,8
C0257C5	3,8	4,6
C0260E11	4,7	5,4
C0260C6	4,6	5,3
C0262C4	4,8	5,3
C0262F11	5,0	5,5
C0263B7	4,1	4,6
C0263G12	4,9	5,6
C0261H2	4,5	5,3
C0264G5	4,9	5,6
C0264G7	4,1	4,8
C0266A11	4,0	4,9

Устойчивость к темботриону, дикетонитрилу (активная форма изоксафлутола) и мезотриону также

измеряли с использованием способа ВЭЖХ. Значения представляют собой pI_{50} . Знак ">" означает, что значение выходило за пределы диапазона измерения в данном исследовании (например, что значение чувствительности фермента больше, чем указанное далее значение).

Таблица 8

HPPD	pI_{50} темботриона	pI_{50} дикетонитрила	pI_{50} мезотриона
	ВЭЖХ	ВЭЖХ	ВЭЖХ
PfHPPD	4,9	4,7	4,7
PfG336W	4,6	4,2	4,3
PfHPPDEvo37	4,1	3,6	н.о.
C023E6	4,3	3,5	н.о.
C024H11	4,8	4,0	н.о.
PfHPPDEvo33	5,2	3,6	н.о.
PfHPPDEvo36	5,2	4,2	н.о.
PfHPPDEvo40	5,0	3,2	н.о.
CO210d10	5,9	3,9	н.о.
CO212f3	4,8	3,8	н.о.
C644	5,5	4,5	5,1
C645	5,2	4,7	5,1
c0218A5	5,0	3,7	4,6
c0216C6	4,8	3,1	4,2
c0213H10	4,5	3,4	4,3
PfHPPDEvo41	4,9	3,4	н.о.
C0228G9	4,6	4,2	4,2
C0232D2	н.о.	н.о.	н.о.
C0234A4	5,0	н.о.	н.о.
C0235F6	5,0	н.о.	н.о.
C0235E2	4,9	н.о.	н.о.
C0236H7	5,1	н.о.	н.о.
C0236F8	4,9	н.о.	н.о.
C0240D2	4,8	н.о.	н.о.
C0240D12	4,9	н.о.	н.о.

Как показано в табл. 8, несколько мутантов HPPD проявляли улучшенную устойчивость к каждому из ингибиторов, темботриону, дикетонитрилу (изоксафлутол) и мезотриону.

Устойчивость отобранных мутантов HPPD к темботриону, дикетонитрилу и мезотриону также измеряли с помощью исследования с соотношением активности HPPD с развитием окраски (описанного в примере 2). Значения представляют собой pI_{50} .

Таблица 9

HPPD	pI_{50} темботриона	pI_{50} дикетонитрила	pI_{50} мезотриона	K_m (мкМ)	SEQ ID NO:
	HGD	HGD	HGD		
PfHPPD	6,4	5,8	5,8	187	1
PfG336W	6,0	5,3	5,5	141	2
PfHPPDEvo33	6,2	4,6	5,5	581	6
PfHPPDEvo40	6,2	4,2	4,8	509	8
PfHPPDEvo41	5,6	4,2	4,3	336	16

Как показано в табл. 9, мутанты HPPD более устойчивы к любому исследованному ингибитору HPPD по сравнению с ферментом HPPD дикого типа. Таким образом, настоящее изобретение включает мутантные ферменты HPPD, которые проявляют значительно улучшенную устойчивость к нескольким ингибиторам HPPD одновременно. Устойчивость к другим ингибиторам HPPD из класса, описанного в WO 2012/028579 (который полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки, но особенно в

отношении соединений, описанных в настоящей заявке в табл. 10B), также измеряли для ферментов HPPD, перечисленных в табл. 10. Устойчивость оценивали в условиях *in vitro* с помощью исследования с соотношением активности HPPD с развитием окраски (HGD), описанного выше. Значения представляют собой pI_{50} .

Таблица 10

	pI_{50} (исследование HGD)	
	Соединение №4-253, определенное в: WO 2012/028579	Соединение №4-278, определенное в: WO 2012/028579
PfG336W	6,2	6,6
PfHPPD	6,4	5,9
PfHPPDEvo40	5,5	6,1
PfHPPDEvo41	5,4	5,6

Таким образом, отобранные мутанты проявляют устойчивость к широкому спектру гербицидов-ингибиторов HPPD.

Пример 6. Исследование устойчивости к гербициду-ингибитору HPPD в условиях *in planta*

Растения сои, экспрессирующие фермент, устойчивый к ингибитору HPPD, согласно настоящему изобретению, совместно с геном, придающим устойчивость к глифосату, и геном, придающим устойчивость к глюфозинату, исследовали для определения устойчивости к темботриону. Опрыскиватель DeVries Tracker калибровали перед каждым распылением. Химический состав, использованный для исследования темботриона, представлял собой состав LAUDIS® SC. Исследования с распылением проводили с использованием 184 г/га 34,5% TBT. Устойчивость оценивали через одну неделю после распыления. Ранг "+" присваивали растениям, активно растущие ткани которых были полностью обесцвеченными. Ранг "++" присваивали растениям, имеющим незначительную устойчивость, т.е. новые ткани растения имели некоторую степень зеленого окрашивания и не были полностью обесцвеченными. Ранг "+++" присваивали растениям, на которые распыление оказывало очень небольшое влияние, т.е., присутствовал некоторый хлороз или очень незначительное обесцвечивание. Результаты этих исследований приведены в табл. 11.

Таблица 11

HPPD	Кол-во обработанных растений	+	++ или +++	% ++ или +++
PfG336W	2248	811	160	7,12
PfHPPDEvo37	35	17	3	8,57
PfHPPDEvo33	151	50	54	35,76
PfHPPDEvo40	207	60	65	31,4
PfHPPDEvo41	852	412	279	32,75
PfHPPDEvo36	88	47	18	20,45

Трансформанты T1, экспрессирующие PfG336W и PfHPPDEvo41 (каждый также экспрессирует ген, придающий устойчивость к глифосату, и ген, придающий устойчивость к глюфозинату), оценивали в полевых испытаниях. Растения опрыскивали 1х раствором глюфозината на стадии v2-v3. Через пять дней после обработки глюфозинатом выжившие растения опрыскивали 2х раствором темботриона, 2х раствором мезотриона или 2х раствором изоксафлутола, и оценивали для определения фитотоксичности через 7 дней. Средняя фитотоксичность для девяти из 18 трансформантов, экспрессирующих PfHPPDEvo41, и 0 из 18 трансформантов, экспрессирующих PfG336W, составила 20% или менее в результате послевсходового применения темботриона в концентрации 200 г д.в./га.

В полевых испытаниях, проведенных в Аргентине, максимальная фитотоксичность для 5 из 10 трансформантов T2 PfHPPDEvo41 и 1 из 3 трансформантов PfGW336 составила 18% или менее в результате послевсходового применения изоксафлутола в концентрации 210 г д.в./га.

В полевых испытаниях, проведенных в Соединенных Штатах Америки (штат Миннесота), максимальная фитотоксичность для 7 из 7 трансформантов T2 PfHPPDEvo41, и 1 из 11 трансформантов PfGW336 составила 25% или менее в результате послевсходового применения темботриона в концентрации 200 г д.в./га.

Пример 7. Получение мутантов других ферментов HPPD

Штаммы ATX22717 и ATX1974 выявляли с использованием количественного исследования, соотносящего активность HPPD с возникновением розового/оранжевого окрашивания, которое можно детектировать визуально. Включение агентов, вызывающих тушение хинона, использовали для улучшения чувствительности исследования в условиях *in vitro*. Использованный агент, вызывающий тушение хино-

на, представлял собой MBTH или 3-метил-2-бензотиазолинон гидразон. Оба типа ферментов, фенолоксидазы и HPPD, являются диоксигеназами, которые производят соединение хинона в качестве промежуточного продукта; такие хиноны затем быстро и спонтанно претерпевают ряд перестроек электронов с образованием последующего продукта, который является более стабильным, такого как меланин (в случае фенолоксидаз) или гомогентисат (в случае HPPD), и нерастворимым. При образовании комплекса с хиноном, продукт MBTH-хинон приводит к возникновению розового/оранжевого окрашивания. Добавление агента MBTH, вызывающего тушение хинона, увеличивает чувствительность исследования приблизительно в 5 раз.

Штаммы выращивали в LB-агаре в течение приблизительно 24 ч. Клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали в $\frac{1}{2}$ объема 20 мМ HEPES-буфера, pH=7,1 и лизировали путем размалывания гранулами. По 50 мкл экстракта штамма добавляли к 150 мкл реакционной смеси, содержащей MBTH, в 96-луночных планшетах с коническими лунками. Готовая реакционная смесь содержала 10 мМ MBTH, 0 или 1 мМ гидроксибензилпирувата (HPP), 20 мМ HEPES-буфера, pH=7,1, и 0, 10 мкМ или 1 мМ темботриона (TBT). 96-луночный планшет для количественного исследования затем встряхивали при 200 оборотах в минуту в напольном шейкере при температуре 30°C в течение приблизительно 22 ч перед проведением оценки. Было показано, что штаммы ATX22717 и ATX1974 являются устойчивыми к TBT.

Штамм ATX22717 является штаммом *Pseudomonas aeruginosa*, выделенным из образца почвы, собранной в Северной Каролине, США.

Штамм ATX1974 является штаммом *Pseudomonas agarici*, выделенным из образца почвы, собранной в Северной Каролине, США. Гены HPPD выявляли в штаммах с использованием следующих этапов:

Получение тотальной ДНК из штамма. Тотальная ДНК содержит как геномную ДНК, так и внехромосомную ДНК. Внехромосомная ДНК содержит смесь некоторых или всех из следующих: плазмиды различного размера; фаговые хромосомы; другие не охарактеризованные внехромосомные молекулы.

Секвенирование ДНК. Тотальную ДНК секвенируют с помощью способов секвенирования нового поколения (Next-Generation Sequencing).

Сборка последовательности ДНК с помощью различных компьютерных программ, включая Newbler, phredPhrap и CLC.

Выявление генов HPPD с использованием алгоритмов определения гомологии ДНК и белков.

Axmi305H идентифицировали в штамме ATX22717. Нуклеотидная последовательность, кодирующая Axmi305H, приведена в SEQ ID NO: 60, и аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 57. Axmi305H имеет последовательность, на 99,7% идентичную последовательности с SEQ ID NO: 29696 в публикации заявки на патент США № 20070020624.

Axmi309H идентифицировали в штамме ATX1974. Нуклеотидная последовательность, кодирующая Axmi309H, приведена в SEQ ID NO: 61, и аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 58. Axmi309H имеет последовательность, на 99,7% идентичную последовательности, имеющей регистрационный номер GENBANK® YP_348648.

Штамм *Comamonas testosteroni* отобрали в качестве потенциального источника HPPD с полезной ферментативной активностью, поскольку имелись сообщения, что он продуцирует пиомеланин, производное гомогентизиновой кислоты, которая является продуктом активности HPPD (Turick et al., 2005, Microbial Metabolite Field Deployment Report. WSRC-TR-2005-00455).

Результаты поисков в общедоступных базах данных BLAST показали, что существуют два различных белка HPPD, присутствующих у вида бактерий *Comamonas testosteroni*, один имеет длину 362 аминокислоты, а другой длину 373 аминокислоты. Геномную ДНК *Comamonas testosteroni* (каталожный номер ATCC® 700441) амплифицировали способом ПНР с использованием праймеров, сконструированных для каждого из двух генов HPPD на основе опубликованной нуклеотидной последовательности штаммов *Comamonas testosteroni* CNB-2, KF-1 и S44, которая содержится в базе данных BLAST. Продукты ПЦР расщепляли с помощью BspHI и Xba I и клонировали в pSE420, линеаризованный с помощью NcoI и XbaI.

Нуклеотидная последовательность и полученная на ее основании аминокислотная последовательность HPPD, имеющая длину 373 аминокислоты, не является идентичной какой-либо опубликованной последовательности HPPD *Comamonas testosteroni*, согласно результатам поиска алгоритмом BLAST. Эта последовательность на 99% идентична таковой *Comamonas testosteroni* S44. Указанная новая последовательность в настоящее время называется Axmi428H. Нуклеотидная последовательность, кодирующая Axmi428H, приведена в SEQ ID NO: 62, и аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 59.

Активный фермент HPPD будет продуцировать коричневый пигмент, пиомеланин, поскольку он превращает гидроксибензилпируват в гомогентизиновую кислоту. Процесс продукции этого пигмента может быть визуализирован. Клетки DH5alpha, экспрессирующие белок Axmi428H, культивировали до насыщения в среде LB и затем 10 мкл насыщенной культуры точечно наносили на 100 мкл LB-агара в планшетах, содержащих 0, 0,5, 1,0 и 2,0 мМ темботриона. Клетки фотографировали спустя приблизительно 16 ч дополнительного роста при 37°C.

Кинетику Axmi428H также описывали с помощью кинетического исследования в условиях *in vitro*, которое соотносит выработку гомогентизиновой кислоты с активностью фермента гомогентисат-1,2-диоксигеназы (HGO). HGO превращает гомогентизиновую кислоту в малеоацетоацетат, продукцию которого можно измерить по сильному поглощению при длине волны 321 нм. Выработку продукта в режиме реального времени измеряют непрерывно в 96-луночном спектрофотометре в присутствии различных концентраций субстрата, от ограничивающих до насыщающих, что позволяет определить K_m фермента с использованием стандартной кинетики Михаэлиса-Ментен. Значение K_i можно определить путем построения графической зависимости изменения величины K_m в присутствии различных количеств ингибитора темботриона.

Для проведения этого исследования фермент Axmi428H получали, культивируя трансформированные клетки DH5alpha при встряхивании при 250 оборотах в минуту и 37°C до достижения величины OD₆₀₀, равной 0,6-0,7. Затем температуру понижали до 30°C, и культуры продолжали встряхивать в течение приблизительно 20 ч. Клеточные культуры осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 1/20-ой объема буфера, содержащего 20 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH=7,0. Клетки лизировали путем добавления LYSONASE™ (Novagen) в течение 45 мин при комнатной температуре, и замораживали при -20°C в течение не менее 1 ч. Клеточные экстракты оттаивали непосредственно перед проведением исследования, очищали с помощью центрифугирования, и исследовали для определения активности в присутствии различных концентраций субстрата и ингибитора с избытком фермента HGO. Анализ кинетических данных позволяет получить кинетические константы, указанные в приведенной ниже таблице. Axmi428H имеет аналогичный уровень устойчивости к темботриону, что и мутантный ген PfG336W, и оба проявляют более высокий уровень устойчивости, чем нативный HPPD *soi*.

Таблица 12

Ген	K_m HPP (мкМ)	V_{max}	K_i TBT (мкМ)
HPPD <i>soi</i>	32,5	79	0,04
W336	152	35	2,49
Axmi428H	52	22,6	1,37

Мутации, присутствующие в некоторых мутантных ферментах HPPD, описанных в настоящей заявке, вводили в соответствующие положения других нативных ферментов HPPD, включая Axmi305H, Axmi309H и Axmi428H, чтобы улучшить устойчивость этих ферментов. в табл. 13 приведены величины идентичности последовательностей между различными белками HPPD. Выравнивание выполняли с использованием программы AlignX.

Таблица 13

	PfG336W	Axmi309H	Axmi428H	Axmi305H
PfG336W	100	94	56	53
Axmi309H	94	100	56	54
Axmi428H	56	56	100	54
Axmi305H	53	54	54	100

Набор для быстрого сайт-направленного мутагенеза QUIKCHANGE® использовали для сайт-направленного мутагенеза генов в векторе pSE420. Мутантов, полученных с помощью такого подхода, трансформировали в клетки BL21-DE3* и выращивали до насыщения в среде LB. Аликвоты затем точно наносили на планшеты с LB-агаром, содержащим различные количества темботриона. При использовании этого способа активный фермент HPPD будет вырабатывать коричневый пигмент приблизительно через 24 ч культивирования в планшетах. С помощью этого исследования было показано, что все полученные мутанты имели активный фермент HPPD, который обладал высокой устойчивостью к ингибированию темботрионом.

Устойчивость мутантов в отношении темботриона, дикетонитрила (изоксафлутола) и мезотриона также измеряли с помощью способа соотнесения активности HPPD с развитием окраски. Результаты показаны в табл. 14. Знак ">>" означает, что значение находится вне диапазона измерения, но значительно превышает число, указанное за ним.

Таблица 14

	pI ₅₀ темботриона	pI ₅₀ дикетонитрила	pI ₅₀ мезотриона	K _m (мкМ)
PfG336W	6,4	5,8	5,8	187
PfHPPDEvo40	6,2	4,2	4,8	509
PfHPPDEvo41	5,6	4,2	4,3	336
Axmi305H	6,7	6,5	6,7	116
Axmi305H-Evo40	5,8	5,5	5,3	721
Axmi305H-Evo41	6,8	5,0	5,2	816
Axmi309H	6,4	6,4	6,1	318
Axmi309H-Evo40	5,9	4,4	5,2	290
Axmi309H-Evo41	6,2	4,5	4,7	807
Axmi428H	7,2	7,0	6,7	47
Axmi428H-Evo40	6,1	5,2	5,5	1490
Axmi428H-Evo41	5,6	4,3	5	>>1000

Данные в табл. 14 показывают, что мутации или комбинации мутаций, выявленные в настоящей заявке, эффективно участвуют в улучшении устойчивости к ингибиторам HPPD, независимо от характера белка HPPD, в который они введены.

Пример 8. Клонирование генов HPPD в каскету экспрессии в растениях

Для каждого из генов HPPD, описанных в настоящей заявке, открытая рамка считывания (ОРС) может быть амплифицирована на основе полноразмерной ДНК-матрицы с помощью ПНР. Сайты рестрикции Hind III могут быть добавлены к каждому концу ОРС при проведении ПНР. Нуклеотидная последовательность АСС также может быть добавлена непосредственно к 5'-концу стартового кодона гена, чтобы повысить эффективность трансляции (Kozak (1987) *Nucleic Acids Research* 15:8125-8148; Joshi (1987) *Nucleic Acids Research* 15: 6643-6653). Продукт ПНР можно клонировать и секвенировать с использованием методик, хорошо известных в данной области техники, чтобы убедиться в том, что какие-либо мутации не были введены во время ПНР.

Плазмида, содержащая продукт ПНР, может быть расщеплена с помощью Hind III, и фрагмент, содержащий интактную ОРС, может быть выделен. Этот фрагмент может быть клонирован в сайт Hind III плазмиды, такой как pAX200, вектор экспрессии в растениях, содержащий промотор актина риса (McElroy et al. (1991) *Molec. Gen. Genet.* 231:150-160) и терминатор PinII (An et al. (1989) *The Plant Cell* 1: 115-122). Фрагмент промотор-ген-терминатор из этой промежуточной плазмиды может быть затем субклонирован в плазмиду pSBII (Japan Tobacco, Inc), с образованием готовой плазмиды на основе pSBII.

Такие плазмиды на основе pSB11, как правило, организованы таким образом, что фрагмент ДНК, содержащий конструкцию промотор-ген-терминатор, может быть вырезан путем двойной рестрикции с помощью рестриктаз, таких как Kpn I и Pme I, и использован для трансформации в растения путем инъекции аэрозольным потоком. Структура полученных клонов на основе pSB11 может быть подтверждена путем расщепления рестриктазами и способом гель-электрофореза, а также с помощью секвенирования по различным узлам клонирования.

Плазмида может быть мобилизована в штамм *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, который также несет плазмиду pSB1 (Japan Tobacco, Inc), с использованием процедуры трехродительского (triparental mating) спаривания, хорошо известной в данной области техники, с последующим высевом на среды, содержащие спектиномицин. Клон плазмиды на основе pSB11 несет ген устойчивости к спектиномицину, но имеет небольшой спектр подходящих хозяев и не может реплицироваться в *Agrobacterium*. Колонии, устойчивые к спектиномицину, возникают, когда плазмиды на основе pSB11 интегрируются в плазмиду pSB1, имеющую широкий спектр хозяев, посредством гомологичной рекомбинации. Продукт совместной интеграции pSB1 и плазмиды на основе pSB11 может быть подтвержден с помощью Саузерн-гибридизации. Штамм *Agrobacterium*, несущий продукт совместной интеграции, можно использовать для трансформации кукурузы способами, известными в данной области техники, такими как, например, способ PureIntro (Japan Tobacco).

Пример 9. Трансформация сои

Трансформация сои достигается с помощью способов, хорошо известных в данной области техники, например, описанного способа с использованием трансформации семядольных эксплантов сои ("полусемянных" эксплантов), опосредованной *Agrobacterium tumefaciens*, используя по существу способ, описанный в работе Paz et al. (2006), *Plant cell Rep.* 25: 206. Трансформантов выявляли с использованием изоксафлутола или темботриона в качестве маркера для селекции. Наблюдали появление зеленых побе-

гов, документально подтвержденное как показатель устойчивости к гербициду изоксафлутолу или темботриону. Устойчивые трансгенные побеги будут проявлять нормальный уровень зеленого окрашивания, сравнимый с таковым для побегов сои дикого типа, не обработанных изоксафлутолом или темботрионом, тогда как побеги сои дикого типа, обработанные таким же количеством изоксафлутола или темботриона, будут полностью обесцвеченными. Это указывает на то, что присутствие белка HPPD обеспечивает устойчивость к гербицидам-ингибиторам HPPD, таким как изоксафлутол или темботрион.

Устойчивые зеленые побеги переносят в среды для укоренения или прививают. Укорененные ростки будут перенесены в теплицу после периода акклиматизации. Растения, содержащие трансген, затем опрыскивают гербицидами-ингибиторами HPPD, например, темботрионом при скорости потока 100 г д.в./га. Через десять дней после применения симптомы, связанные с применением гербицида, оценивают и сравнивают с симптомами, наблюдаемыми на растениях дикого типа при тех же условиях.

Пример 10. Создание и отбор растений хлопчатника T0.

Трансформацию хлопчатника осуществляют с помощью способов, хорошо известных в данной области техники, особенно предпочтительным способом является тот, который описан в публикации заявки на патент PCT WO 00/71733. Регенерировавшие растения переносят в теплицу. После периода акклиматизации растения, подросшие до достаточного размера, опрыскивают гербицидами-ингибиторами HPPD, например, темботрионом, в концентрации эквивалентной 100 г д.в./га с добавлением сульфата аммония и сложного метилового эфира рапсового масла. Через семь дней после распыления, симптомы, связанные с обработкой гербицидом, оценивают и сравнивают с симптомами, наблюдаемыми на растениях хлопчатника дикого типа, подвергнутых той же обработке в аналогичных условиях.

Пример 11. Трансформация клеток растения кукурузы с помощью *Agrobacterium*-опосредованной трансформации

Оптимальный срок сбора початков кукурузы наступает через 8-12 дней после опыления. Из початков выделяют зародыши, и зародыши размером 0,8-1,5 мм являются предпочтительными для использования при трансформации. Зародыши высевают щитком вверх на подходящие инкубационные среды, и инкубируют в течение ночи при 25°C в темноте.

Тем не менее, нет необходимости *per se* инкубировать зародыши в течение ночи. Зародыши приводят в контакт со штаммом *Agrobacterium*, содержащим соответствующие векторы, несущие нуклеотидную последовательность согласно настоящему изобретению, для передачи, опосредованной T1-плазмидой, в течение приблизительно 5-10 мин, а затем высевают на среды для совместного культивирования в течение приблизительно 3 дней (25°C в темноте). После совместного культивирования экспланты переносят в среды для периода восстановления в течение приблизительно пяти дней (при 25°C в темноте). Экспланты инкубируют в селективных средах не более восьми недель, в зависимости от характера и особенностей используемого конкретного способа отбора. После периода отбора полученный каллус переносят в среды для созревания зародышей, до образования наблюдаемых зрелых соматических зародышей. Полученные зрелые соматические зародыши помещают под слабое освещение и инициируют процесс регенерации, как известно в данной области техники. Полученные побеги культивируют до образования корней в средах для укоренения, и полученные растения переносят в горшки для рассады и размножают как трансгенные растения.

Все публикации и заявки на патент, упомянутые в данном описании, свидетельствуют об уровне квалификации специалистов в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Все публикации и заявки на патент включены в настоящее описание посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или заявка на патент была конкретно и индивидуально указана для включения посредством ссылки.

Несмотря на то, что вышеизложенное изобретение было подробно описано с помощью иллюстраций и примеров для целей ясности понимания, будет очевидно, что определенные изменения и модификации могут быть осуществлены в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая фермент 4-гидроксифенилпируват диоксигеназу (HPPD), имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70% идентична последовательности SEQ ID NO: 1, или фрагмент указанной молекулы нуклеиновой кислоты, который кодирует фрагмент указанного фермента, сохраняющий биологическую активность полноразмерного фермента HPPD, имеющего SEQ ID NO: 1, при этом указанная аминокислотная последовательность содержит набор аминокислотных замен, выбранных из группы, включающей:

- а) пролин в положении, соответствующем положению 335 SEQ ID NO: 1, и триптофан в положении, соответствующем положению 336 SEQ ID NO: 1;
- б) серин в положении, соответствующем положению 335 SEQ ID NO: 1, серин в положении, соответствующем положению 336 SEQ ID NO: 1, треонин в положении, соответствующем положению 339 SEQ ID NO: 1, и глутамин в положении, соответствующем положению 340 SEQ ID NO: 1;
- с) триптофан в положении, соответствующем положению 188 SEQ ID NO: 1, и триптофан в поло-

жении, соответствующем положению 336 SEQ ID NO: 1;

d) пролин в положении, соответствующем положению 335 SEQ ID NO: 1, серин в положении, соответствующем положению 336 SEQ ID NO: 1, и глутаминовую кислоту в положении, соответствующем положению 340 SEQ ID NO: 1; и

e) пролин в положении, соответствующем положению 335 SEQ ID NO: 1, триптофан в положении, соответствующем положению 336 SEQ ID NO: 1, аланин в положении, соответствующем положению 339 SEQ ID NO: 1, и глутамин в положении, соответствующем положению 340 SEQ ID NO: 1;

причем указанный фермент HPPD или его фрагмент являются устойчивыми к гербициду-ингибитору HPPD.

2. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п.1, которая кодирует HPPD, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична любой аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3-59, или фрагменты HPPD, которые сохраняют биологическую активность полноразмерного фермента HPPD согласно SEQ ID NO:1 и которые являются устойчивыми к гербициду-ингибитору HPPD.

3. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая фермент HPPD, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 1, или фрагмент указанной молекулы нуклеиновой кислоты, который кодирует фрагмент указанного фермента, сохраняющий биологическую активность полноразмерного фермента HPPD, имеющего SEQ ID NO:1, при этом указанные аминокислотные последовательности содержат замены аминокислот:

a) пролин в положении, соответствующем положению 335 SEQ ID NO: 1;

b) серин в положении, соответствующем положению 335 SEQ ID NO: 1, серин в положении, соответствующем положению 336 SEQ ID NO: 1, треонин в положении, соответствующем положению 339 SEQ ID NO: 1, и глутамин в положении, соответствующем положению 340 SEQ ID NO: 1;

c) триптофан в положении, соответствующем положению 188 SEQ ID NO: 1;

d) пролин в положении, соответствующем положению 335 SEQ ID NO: 1, серин в положении 336 SEQ ID NO: 1, и глутаминовую кислоту в положении, соответствующем положению 340 SEQ ID NO: 1; и

e) пролин в положении, соответствующем положению 335 SEQ ID NO: 1, аланин в положении, соответствующем положению 339 SEQ ID NO: 1, и глутамин в положении, соответствующем положению 340 SEQ ID NO: 1;

причем указанный фермент HPPD является устойчивым к гербициду-ингибитору HPPD.

4. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая фермент HPPD, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 1, или фрагмент указанной молекулы нуклеиновой кислоты, который кодирует фрагмент указанного фермента, сохраняющий биологическую активность полноразмерного фермента HPPD, имеющего SEQ ID NO: 1, при этом указанная аминокислотная последовательность содержит аминокислотные замены:

триптофан в положении 188 и триптофан в положении 336 SEQ ID NO:1;

причем указанный фермент HPPD является устойчивым к гербициду-ингибитору HPPD.

5. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-4, отличающаяся тем, что является синтетической последовательностью, которая была сконструирована для экспрессии в растениях.

6. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-4, отличающаяся тем, что функционально связана с промотором, способным управлять ее экспрессией в клетке растения.

7. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п.1, отличающаяся тем, что указанный гербицид-ингибитор HPPD выбран из группы, состоящей из N-(тетразол-4-ил)- или N-(триазол-3-ил)арилкарбоксамиды, N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамида, темботриона, салкотриона, топрамезона, бикциклопилона, тефурилтриона, изоксафлутола, пирасульфотолы и мезотриона.

8. Вектор для экспрессии фермента HPPD, содержащий указанную молекулу нуклеиновой кислоты по п.1.

9. Вектор по п.8 для экспрессии фермента HPPD, дополнительно содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный полипептид.

10. Клетка-хозяин, содержащая указанную рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты по п.1.

11. Клетка-хозяин по п.10, которая представляет собой бактериальную клетку-хозяин.

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

13. Трансгенное растение, обладающее повышенной устойчивостью к гербициду-ингибитору HPPD, содержащее рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты по п.1.

14. Растение по п.13, отличающееся тем, что указанное растение выбрано из группы, состоящей из кукурузы, сорго, пшеницы, подсолнечника, томата, крестоцветных, перцев, картофеля, хлопчатника, риса, соевых бобов, сахарной свеклы, сахарного тростника, табака, ячменя и масличного рапса.

15. Трансгенное семя, содержащее рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты по п.1.

16. Рекомбинантный полипептид, содержащий фермент HPPD, который является устойчивым к гербициду-ингибитору HPPD и имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 55% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1, или фрагменту указанного фермента HPPD, который сохраняет биологическую активность полноразмерного фермента HPPD, имеющего SEQ ID NO:1, при

этом указанная аминокислотная последовательность содержит набор аминокислотных замен, выбранных из группы включающей:

- а) пролин в положении, соответствующем положению 335 SEQ ID NO: 1, и триптофан в положении, соответствующем положению 336 SEQ ID NO: 1;
- б) серин в положении, соответствующем положению 335 SEQ ID NO: 1, серин в положении, соответствующем положению 336 SEQ ID NO: 1, треонин в положении, соответствующем положению 339 SEQ ID NO: 1, и глутамин в положении, соответствующем положению 340 SEQ ID NO: 1;
- в) триптофан в положении, соответствующем положению 188 SEQ ID NO: 1, и триптофан в положении, соответствующем положению 336 SEQ ID NO: 1;
- д) пролин в положении, соответствующем положению 335 SEQ ID NO: 1, серин в положении, соответствующем положению 336 SEQ ID NO: 1, и глутаминовую кислоту в положении, соответствующем положению 340 SEQ ID NO: 1; и
- е) пролин в положении, соответствующем положению 335 SEQ ID NO: 1, триптофан в положении, соответствующем положению 336 SEQ ID NO: 1, аланин в положении, соответствующем положению 339 SEQ ID NO: 1, и глутамин в положении, соответствующем положению 340 SEQ ID NO: 1.

17. Рекомбинантный полипептид по п.16, отличающийся тем, что имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3-59.

18. Рекомбинантный полипептид HPPD, который является устойчивым к гербициду-ингибитору HPPD и имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 1, или его фрагмент, который сохраняет биологическую активность полного фермента HPPD, имеющего SEQ ID NO:1, причем указанная аминокислотная последовательность содержит набор аминокислотных замен, выбранных из группы:

- а) пролин в положении, соответствующем положению 335 SEQ ID NO: 1;
- б) серин в положении, соответствующем положению 335 SEQ ID NO: 1, серин в положении, соответствующем положению 336 SEQ ID NO: 1, треонин в положении, соответствующем положению 339 SEQ ID NO: 1, и глутамин, соответствующем положению в положении 340 SEQ ID NO: 1;
- в) триптофан в положении, соответствующем положению 188 SEQ ID NO: 1;
- д) пролин в положении, соответствующем положению 335 SEQ ID NO: 1, серин в положении, соответствующем положению 336 SEQ ID NO: 1, и глутаминовую кислоту в положении, соответствующем положению 340 SEQ ID NO: 1; и
- е) пролин в положении, соответствующем положению 335 SEQ ID NO: 1, аланин в положении, соответствующем положению 339 SEQ ID NO: 1, и глутамин в положении, соответствующем положению 340 SEQ ID NO: 1.

19. Рекомбинантный полипептид HPPD, который является устойчивым к гербициду-ингибитору HPPD и имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 1, или его фрагмент, который сохраняет биологическую активность полного фермента HPPD, имеющего SEQ ID NO:1, причем указанная аминокислотная последовательность содержит набор аминокислотных замен, выбранных из:

- а) триптофана в положении 188 и триптофана в положении 336 или
- б) пролина в положении 335.

20. Рекомбинантный полипептид по любому из пп.16-19, отличающийся тем, что указанный гербицид-ингибитор HPPD выбран из группы, состоящей из N-(тетразол-4-ил)- или N-(триазол-3-ил)арилкарбоксамиды, N-(1,2,5-оксадиазол-3-ил)бензамида, темботриона, салкотриона, топрамезона, бикциклопирина, тефурилтриона, изоксафлутола, пирасульфотолы и мезотриона.

21. Рекомбинантный полипептид по любому из пп.16-19, дополнительно содержащий гетерологичную аминокислотную последовательность.

22. Способ получения полипептида, обладающего активностью, обеспечивающей устойчивость к гербицидам-ингибиторам HPPD, включающий культивирование клетки-хозяина по п.10 в условиях, обеспечивающих экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный полипептид.

23. Способ придания растению устойчивости к гербициду-ингибитору HPPD, включающий трансформацию указанного растения конструкцией ДНК, причем указанная конструкция содержит промотор, функционально связанный с молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-7, обеспечивающий экспрессию в клетке растения.

24. Растение или часть растения, содержащие конструкцию ДНК, стабильно встроенную в его геном, причем указанная конструкция содержит промотор, функционально связанный с молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-7.

25. Растение или часть растения по п.24, отличающееся тем, что указанная часть растения выбрана из группы, состоящей из клетки растения, ткани растения и семени растения.

26. Растение или часть растения по п.24, отличающееся тем, что указанное растение выбрано из группы, состоящей из кукурузы, сорго, пшеницы, подсолнечника, томата, крестоцветных, перцев, картофеля, хлопчатника, риса, соевых бобов, сахарной свеклы, сахарного тростника, табака, ячменя и маслич-

<i>Pseudomonas fluorescens</i>	S--SIYDIDFVYLEG---VERNFPVGAGLKVVIDHCLTHNVYRGRMVYANFY	179
<i>Avena sativa</i>	D--LPFLPGFERVS-----SPGAVDYGLTRFDHVVG--VPENAPVIDYM	231
<i>Avena sativa</i>	D--LPFLPGFERVS-----SPGAVDYGLTRFDHVVG--VPENAPVIDYM	232
<i>Zea mays</i>	AG-EPFLPGFEGVA-----SPGAADYGLSRFDHIVGN--VPELAPAAAYF	233
<i>Streptomyces avermitilis</i>	G---PYLPGYVAAAPIVEPPAHR---TFQAIDHCVGNVELGRMNHWGFFY	203
<i>Arabidopsis thaliana</i>	TEKSEPLPGFERVEDA--SSFP-LDYGIRRLDHAVGN--VPGLGPAITYV	241
<i>Hordeum vulgare</i>	D--VPFLPGFEGVT-----NPDADVGLTRFDHVVG--VPGLAPAAAYI	226
<i>Daucus carota</i>	---GLFLPGFEAVEGT--ASFPDLDYGIRRLDHAVGN--VTGLGPVVEYI	234
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	G---PFLPGYRCCTTVDSANKFLPPWNLEAIDHCVGNQDNDMDSDACDFY	238
<i>Coccidioides immitis</i>	G---GFMPGYRMESNADATSKFLPKVLERIDHCVGNQDNDMEHRCDDY	217
	: . : : : * . * . :	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	EKLNFREARYF---DIRSEYTGLTSKAMSAPDGMIRIPLNE--ESSKGA	224
<i>Avena sativa</i>	KGFLGFHEFAEFTAEVDGTTESGLHSVVLANNSEAVLLPLNEPVGHTKRR	281
<i>Avena sativa</i>	KGFLGFHEFAEFTAEVDGTTESGLHSVVLANNSEAVLLPLNEPVGHTKRR	282
<i>Zea mays</i>	AGFTGFHEFAEFTEDVGTAEAGLSMVLANNSENVLLPLNEPVGHTKRR	283
<i>Streptomyces avermitilis</i>	NKVMGFTNMKEFVGDDIATEYSALMSKVADGTLKVKFIPNEPALAKK-K	252
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AGFTGFHQFAEFTADDVGTAEAGLSAVLANNDEMVLLEPINEPVGHTKRR	291
<i>Hordeum vulgare</i>	AGFTGFHEFAEFTAEVDGTTESGLHSVVLANNSEGVLLPLNEPVGHTKRR	276
<i>Daucus carota</i>	KGFTGFHEFAEFTAEVDGTTESGLHSVVLANNSEMVLLPLNEPVGHTKRR	284
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	ERCLGFHRFWSVDDKIDICTEFSAKLSIVMSGPNQVVRKMPINEPAHGKK-K	287
<i>Coccidioides immitis</i>	EKILGFHRFWSVDDKIDICTEFSAKLSIVMSGPNQVVRKMPINEPAHGKK-Q	266
	. * . . * : : * * . : : : : * : * : *	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	GQIEEFLMQFNHGEIGQHVAFITDOLVKTNDALEKIG---HREHTAPPDT	270
<i>Avena sativa</i>	SQIQTYLEYHGGFPGVQHIALASNDVLRITLREMRARITPMGGFEFMAPPQAK	331
<i>Avena sativa</i>	SQIQTYLEYHGGFPGVQHIALASNDVLRITLREMRARITPMGGFEFMAPPQAK	332
<i>Zea mays</i>	SQIQTFLDHNGGFGVQHIALASDDVLRITLREMQARSAMGGFEFMAPPQAK	333
<i>Streptomyces avermitilis</i>	SQIDEXLEYFGGAGVQHIALNTGDIIVETVTRTMAA---GVQFLDTP-DS	297
<i>Arabidopsis thaliana</i>	SQIQTYLEHNEGAGLQHLALMSSEDIPTLREMRKRSSIGGFDPMSPPT	341
<i>Hordeum vulgare</i>	SQIQTFLEHNGGFGVQHIALAVASSDVLRLTKMRARSAMGGFDLPLPLPK	326
<i>Daucus carota</i>	SQIQTYLEHNEGAGVQHIALVSEDIPTLREMRKRSCLGGEFPMSPPT	334
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	SQIEEYVDFYNGFPGVQHIALRIPNIIIEAVSNLRSR---GVEFISVP-DI	332
<i>Coccidioides immitis</i>	SQIEEYVDFYNGAGVQHIALRTNNIIDAITNLKAR---GTEFIAVP-ET	311
	. * : : * * : * : : : : : : * : *	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	YYEMLEGRLPDHG---EPVDQLQARGILLDGSSVEGDKRLQLQIFSETL	316
<i>Avena sativa</i>	YYEGVRRRAGDVLS--EEQIEKCEQLGLVLD---RDDQGVLLQIFTKPV	375
<i>Avena sativa</i>	YYEGVRRRAGDVLS--EEQIEKCEQLGLVLD---RDDQGVLLQIFTKPV	376
<i>Zea mays</i>	YYDGVRRRAGDVLT--EAQIEKCEQLGLVLD---RDDQGVLLQIFTKPV	377
<i>Streptomyces avermitilis</i>	YYDTLGEWVGD---RVPVDTLRELKILAD---RDEDGYLLQIFTKPV	339
<i>Arabidopsis thaliana</i>	YYQMLKKRVGDVLS--DDQIEKCEELGLVLD---RDDQGTLLQIFTKPL	385
<i>Hordeum vulgare</i>	YYEGVRRRAGDVLS--EAQIEKCEQLGLVLD---RDDQGVLLQIFTKPV	370
<i>Daucus carota</i>	YYKMLKRVGDVLS--DEQIEKCEELGLVLD---RDDQGTLLQIFTKPV	378
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	YYENMLRLRPAAGMKLEESFDIIQKLNILID---FDEGGYLLQIFTKPL	378
<i>Coccidioides immitis</i>	YYENMLRLRPAAGMKLEESFDIIQKLNILID---FDEGGYLLQIFTKPL	375
	** : : . . . * * . : * * : * :	

Фиг. 1B

<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MG--PVFFEFIQRK-----GDDGFGEGNFKALEFESIERDQ	349
<i>Avena sativa</i>	GDRPTFFLEMIQRIGCMKEKDEVGQYQKGGCGGFGKGNFSELFKSIEDYE	425
<i>Avena sativa</i>	GDRPTFFLEMIQRIGCMKEKDEVGQYQKGGCGGFGKGNFSELFKSIEDYE	426
<i>Zea mays</i>	GDRPTLFLEIIQRIGCMKEKDEVGQYQKGGCGGFGKGNFSQLFKSIEDYE	427
<i>Streptomyces avermitilis</i>	QDRPTVFIEIIERH-----GSMGFGKGNFKALEFESIEREQ	374
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GDRPTIFIEIIQRVGCMMKDEEGKAYQSGGCGGFGKGNFSELFKSIEEYE	435
<i>Hordeum vulgare</i>	GDRPTLFLEMIQRIGCMKEKDEGEEYQKGGCGGFGKGNFSELFKSIEDYE	420
<i>Daucus carota</i>	GDRPTLFIEIIQRVGCMLKDDAGQMYKGGCGGFGKGNFSELFKSIEEYE	428
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	MDRPTVFIEIIQRN-----NFDGFGAGNFKSLFEAIEREQ	413
<i>Coccidioides immitis</i>	MDRPTVFIEIIQRN-----NFDGFGAGNFKSLFEAIEREQ	392
	. . * : * : * . * * * * * : * * : *	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	VRRGVLTAD-----	358
<i>Avena sativa</i>	KSLEVKQSVVAQKS---	439
<i>Avena sativa</i>	KSLEVKQSVVAQKS---	440
<i>Zea mays</i>	KSLEAKQAAAAAQGS	444
<i>Streptomyces avermitilis</i>	EKRGNL-----	380
<i>Arabidopsis thaliana</i>	KTLEAKQIVG-----	445
<i>Hordeum vulgare</i>	KSLEAKQSAVQGS---	434
<i>Daucus carota</i>	KTLEAKQITGSAAA---	442
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	DLRGNL-----	419
<i>Coccidioides immitis</i>	ALRGIL-----	399

Фиг. 1C

