

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 043348

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.05.16

(21) Номер заявки
201791613

(22) Дата подачи заявки
2016.01.20

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

(54) РАСТЕНИЯ С ПОВЫШЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГЕРБИЦИДАМ

(31) 15151966.7

(32) 2015.01.21

(33) EP

(43) 2017.12.29

(86) PCT/IB2016/050268

(87) WO 2016/116870 2016.07.28

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БАСФ SE (DE)

(72) Изобретатель:
Шахтшабел Дорен, Штайнхардт
Биргит, Зизай Михирет Текесте, Треш
Штефан, Маёр Юлия, Фогт Флориан,
Кало Фредерик, Лерхл Энс (DE)

(74) Представитель:
Беляева Е.Н. (BY)

(56) WP-0193726481
WP-0528627851
CN-A-102954959
CN-A-1546673
ZHANG, X. et al.: "Recent Advances in
Cellulose Biosynthesis Inhibiting (CBI) Herbicides",
World Pesticides, vol. 35, № 2, 30 April 2013
(2013-04-30), see the whole document, especially
page 12, right column, paragraphs 2-6
WO-A1-2010025499
WO-A2-2014107660

(57) Изобретение касается растения или части растения, содержащих полинуклеотид, кодирующий полипептид TriA дикого типа или мутированной TriA, при этом экспрессия указанного полинуклеотида придает растению или части растения устойчивость к гербицидам.

043348 B1

043348 B1

043348

B1

Настоящей заявкой испрашивается приоритет по Европейской заявке EP 15151966.7, поданной 21 января 2015 г., полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Область изобретения

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

Предпосылки к созданию изобретения

Микроорганизмы зачастую реагируют на введение ксенобиотиков в среду за счет развития механизмов их использования, как источника питательных веществ и энергии для их роста. Поскольку структура гербицидов, которая основана на s-триазиновом кольце, отличается от природных соединений (Esseg et al., 1975), микроорганизмы медленно выработали ферменты и метаболические пути, способные их выводить. Суперсемейство амидогидролазы включает поразительный набор ферментов, которые катализируют гидролиз большого количества субстратов, содержащих функциональные группы амидов или сложных эфиров в углеродных и фосфорных центрах. Во всех случаях нуклеофильная молекула воды активируется за счет комплексообразования с одноядерным или двухядерным центром металла. В моноядерных центрах металла субстрат активируется протонным переносом из активного участка, а вода активируется лигатурой металла и обычным катализом основания. Центры металла осаждаются на С-концевой области сердцевинного бета-бочки в пределах (бета альфа) 8-го структурного домена. Одним из отличных примеров является зависящий от атразинхлорогидраза (AtzA), зависящий от Fe(II) гомогексамер ((Seffernick et al., 2002; Wackett et al., 2002), который является катализатором гидролитического дехлорирования атразина, гербицида, из которого получается негербицидный продукт 2-гидроксиатразин (de Souza et al., 1996; Seffernick et al., 2002; Sadowsky and Wackett 2000). Наиболее близкой к AtzA родственной формой из известных является меламиндиаменаза (TriA из *Pseudomonas* sp. штамм NRRL B-12227; 98% идентичности последовательности). Несмотря на большую схожесть последовательности AtzA и TriA отличаются по своим каталитическим свойствам. TriA - это диаменаза с активностью дехлориназы на несколько порядков ниже ее физиологической активности диаменазы, тогда как AtzA - это дехлориназа без заметной активности диаменазы. В предыдущей работе было показано, что три из девяти аминокислот, которые отличаются двумя протеинами (S331C; N328D; и F84I AtzA), в значительной степени отвечают за различия в возникновении специфических каталитических свойств.

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

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

Существуют три основные стратегии повышения устойчивости растений к гербицидам, а именно

(1) детоксификация гербицида ферментами, которые трансформируют гербицид или его активный метаболит в нетоксичные продукты, такими как, например, ферменты для повышения устойчивости к бромксинилу или баста (EP 242236, EP 337899);

(2) мутация целевого фермента в функциональный фермент, который будет менее чувствителен к гербицидам или его активному метаболиту, например ферменты для повышения устойчивости к глифосату (EP 293356, Padgett S.R. et al., J. Biol. Chem., 266, 33, 1991); или

(3) сверхэкспрессия чувствительного фермента для получения достаточного количества целевого фермента в растении относительно гербицида с точки зрения кинетических констант этого фермента, чтобы получить достаточное количество функционального фермента, несмотря на присутствие его ингибитора.

Эта проблема решается объектом настоящего изобретения.

Краткое изложение сущности изобретения

Соответственно согласно одному аспекту настоящим изобретением предоставляется растение или часть растения, содержащие полинуклеотид, кодирующий полипептид TriA дикого типа или мутированной TriA, при этом экспрессия указанного полинуклеотида придает растению или части растения устойчивость к гербицидам.

В соответствии с некоторыми аспектами изобретения настоящим изобретением предоставляется семя, способное развиваться в растение, содержащее, по меньшей мере, в некоторых своих клетках поли-

нуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растений, при этом промотор способен экспрессировать полипептид TgIA дикого типа или мутированной TgIA, кодированный указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида TgIA дикого типа или мутированной TgIA придает указанному растению устойчивость к гербицидам.

В соответствии с одним аспектом настоящим изобретением предоставляется клетка растения или клетка, способная к регенерации растения, содержащего, по меньшей мере, в некоторых своих клетках полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растений, при этом промотор способен экспрессировать полипептид TgIA дикого типа или мутированной TgIA, кодированный указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида TgIA дикого типа или мутированной TgIA придает указанному растению устойчивость к гербицидам, при этом указанная клетка растения содержит полинуклеотид, функционально связанный с промотором.

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

В соответствии с другими аспектами изобретения настоящим изобретением предоставляется растительный продукт, полученный из растения или части растения, содержащих, по меньшей мере, в некоторых своих клетках полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растений, при этом промотор способен экспрессировать полипептид TgIA дикого типа или мутированной TgIA, кодированный указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида TgIA дикого типа или мутированной TgIA придает указанному растению устойчивость к гербицидам.

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

В соответствии с другими аспектами изобретения настоящим изобретением предоставляется способ борьбы с сорняками в месте произрастания растений, при этом указанный способ включает

(а) внесение гербицидной композиции, содержащей гербициды, в место произрастания растений; и
(б) посев семян в месте произрастания растений, при этом семя способно развиваться в растение, содержащее, по меньшей мере, в некоторых своих клетках полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растений, при этом промотор способен экспрессировать полипептид TgIA дикого типа или мутированной TgIA, кодированный указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида TgIA дикого типа или мутированной TgIA придает указанному растению устойчивость к гербицидам.

В соответствии с некоторыми аспектами изобретения настоящим изобретением предоставляется способ борьбы с сорняками в месте произрастания растений, при этом указанный способ включает внесение гербицидной композиции, содержащей гербициды, в место произрастания растений; при этом на указанном месте

(а) произрастает растение или посажено семя, способное развиваться в указанное растение; или
(б) будет произрастать растение или будет посажено такое семя после внесения указанной гербицидной композиции; при этом указанные растение или семя, по меньшей мере, в некоторых своих клетках содержат полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растений, при этом промотор способен экспрессировать полипептид TgIA дикого типа или мутированной TgIA, кодированный указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида TgIA дикого типа или мутированной TgIA придает указанному растению устойчивость к гербицидам.

В соответствии с одним аспектом этап (а) осуществляют перед, после или одновременно с этапом (б).

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

В соответствии с одним аспектом настоящим изобретением предоставляется способ получения потомства растения с устойчивостью к гербицидам, при этом указанный способ включает: скрещивание первого растения, обладающего устойчивостью к гербицидам, со вторым растением для получения потомства растения, обладающего устойчивостью к гербицидам, при этом первое растение и потомство

растения, по меньшей мере, в некоторых своих клетках содержат полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растений, при этом промотор способен экспрессировать полипептид TriA дикого типа или мутированной TriA, кодируемый указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида TriA дикого типа или мутированной TriA придает указанному растению устойчивость к гербицидам.

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

Данный способ включает следующие этапы:

а) получение трансгенной клетки или растения, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую мутированную TriA по настоящему изобретению, где мутированная TriA по настоящему изобретению экспрессирована;

б) нанесение гербицида на трансгенную клетку или растение пункта а) и на контрольную клетку или растение того же вида;

в) определение роста или жизнеспособности трансгенной клетки или растения и контрольной клетки или растения после нанесения указанного тестового соединения; и

д) отбор тестовых соединений, которые привели к уменьшению роста контрольной клетки или растения по сравнению с ростом трансгенной клетки или растения.

Другая задача настоящего изобретения относится к способу идентификации нуклеотидной последовательности, кодирующей мутированную TriA, которая является стойкой или устойчивой к гербициду, при этом указанный способ включает

а) получение библиотеки нуклеиновых кислот, кодирующих мутированную TriA;

б) скрининг популяции полученных нуклеиновых кислот, кодирующих мутированную TriA, путем экспрессии каждой указанной нуклеиновой кислоты в клетке или растении и обработку этой клетки или растения гербицидом;

в) сравнение уровней устойчивости к гербициду, которые получены из данной популяции нуклеиновых кислот, кодирующих мутированную TriA, с уровнями устойчивости к гербициду, которые получены из контрольной нуклеиновой кислоты, кодирующей TriA;

д) селекцию по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты, кодирующей мутированную TriA, которая показывает значительно повышенный уровень устойчивости к гербициду по сравнению с контрольной нуклеиновой кислотой, кодирующей TriA.

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

Стойкость или устойчивость может быть определена путем получения трансгенного растения с последовательностью нуклеиновой кислоты из библиотеки на этапе а) и путем сравнения этого трансгенного растения с контрольным растением.

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

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

(а) молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид с мутированной TriA, и содержащей последовательность SEQ ID NO: 2 или ее вариант, паралог, ортолог или гомолог;

(б) молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность SEQ ID NO: 1 или ее вариант, паралог, ортолог или гомолог;

(в) молекулы нуклеиновой кислоты, которая в результате дегенерации генетического кода может передаваться из последовательности полипептида TriA SEQ ID NO: 2 или ее варианта, паралога, ортолога или гомолога, и придает повышенную устойчивость или стойкость к гербицидам по сравнению с соответствующей, например, нетрансформированной, клеткой растения дикого типа, растением или его частью;

(д) молекулы нуклеиновой кислоты с идентичностью 30% или более, предпочтительно 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5% или более с последовательностью молекулы нуклеиновой кислоты полинуклеотида, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или ее вариант, паралог, ортолог или гомолог, и придает повышенную устойчивость или стойкость к гербицидам по сравнению с соответствующей, например, нетрансформированной, клеткой растения дикого типа, растением или его частью;

(е) молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид с мутированной TriA, с идентично-

стью 30% или более, предпочтительно 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5% или более с аминокислотной последовательностью полипептида TgIA последовательности SEQ ID NO: 2 и придает повышенную устойчивость или стойкость к гербицидам по сравнению с соответствующей, например, нетрансформированной, клеткой растения дикого типа, растением или его частью;

(f) молекулы нуклеиновой кислоты, которая гибридизирует с молекулой нуклеиновой кислоты по пунктам (a), (b), (c), (d) или (e) в жестких условиях гибридизации и придает повышенную устойчивость или стойкость к гербицидам по сравнению с соответствующей, например, нетрансформированной, клеткой растения дикого типа, растением или его частью;

отличающейся тем, что аминокислотная последовательность полипептида с мутированной TgIA отличается от аминокислотной последовательности полипептида TgIA дикого типа в одной или более позициях, соответствующих следующим позициям последовательности SEQ ID NO: 2: 70, 71, 88, 91, 92, 96, 126, 128, 155, 157, 167, 220.

Еще один объект относится к кассете экспрессии, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, а также промотор, функционирующий в клетках растений.

Предпочтительно промотор является корнеспецифичным промотором из *Glycine max*.

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

Предпочтительно аминокислотная последовательность полипептида с мутированной TgIA отличается от аминокислотной последовательности полипептида TgIA дикого типа в одной или более позициях, соответствующих следующим позициям SEQ ID NO: 2: 70, 71, 88, 91, 92, 96, 126, 128, 155, 157, 167, 220.

В соответствии с другими аспектами изобретения настоящим изобретением предоставляется растение или часть растения, содержащие, по меньшей мере, в некоторых своих клетках полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растений, при этом промотор способен экспрессировать полипептид TgIA дикого типа или с мутированной TgIA, кодируемый указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида TgIA дикого типа или с мутированной TgIA придает указанному растению устойчивость к гербицидам, при этом растение или часть растения также обладает характеристикой устойчивости ко второму или третьему гербициду.

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

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

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

В другом варианте осуществления изобретения, изобретение относится к семеню, полученному из трансгенного растения с клеткой растения по настоящему изобретению, в котором семя прорастает благодаря повышению стойкости растения к гербициду по сравнению с семенем дикого типа.

В еще одном варианте осуществления изобретения изобретение относится к способу получения клетки трансгенного растения с повышенной стойкостью к гербициду по сравнению с клеткой растения дикого типа, включая трансформирование клетки растения кассетой экспрессии полинуклеотидом, функционально связанным с промотором, функционирующим в клетках растений, промотором, который способен экспрессировать полипептид с TgIA дикого типа или с мутированной TgIA, кодируемый полинуклеотидом.

В еще одном варианте осуществления изобретения изобретение относится к способу получения трансгенного растения, включающему

(a) трансформирование клетки растения кассетой экспрессии, содержащей полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растений, при этом промотор способен экспрессировать полипептид TgIA дикого типа или мутированной TgIA, кодируемый указанным полинуклеотидом; и

(b) получение из растительной клетки растения с повышенной стойкостью к гербициду.

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

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана химическая реакция, катализатором которой выступает аминоксидаза с TgIA дикого типа и с мутированной TgIA.

На фиг. 2 показано разложение выбранного азина, меламина и атразина, которое происходит под действием мутантов TgIA.

На фиг. 3 показано развитие корня кукурузы, которая трансформирована под действием варианта TgIA или DS в отсутствие или в присутствии 6-циклопентил-N4-(2,3,4,5,6-пентафторфенил)-1,3,5-триазин-2,4-диамина.

На фиг. 4 показан пример развития растений сои, трансформированных под действием мутированной формы TgIA в сочетании с корнеспецифичным промотором и со ссылкой на разновидность дикого типа (разновидность JAKE). Семена T1 в условиях до всхода выращивали и обрабатывали 6-циклопентил-N4-(2,3,4,5,6-пентафторфенил)-1,3,5-триазин-2,4-диамином в указанных количествах.

Подробное описание изобретения

Неопределенные артикли, используемые В настоящем изобретении относятся к одному или нескольким (т.е. по меньшей мере одному) существительным, с которыми употребляется артикль. Например, неопределенный артикль со словом "элемент" означает один или несколько элементов.

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

Термин "борьба с нежелательной растительностью или сорняками" подразумевает уничтожение сорняков и/или замедление или препятствование их нормальному росту. Под сорняками, в широком смысле, подразумеваются все растения, растущие там, где это нежелательно. Термин "сорняки" в соответствии с настоящим изобретением включает, например, двудольные и однодольные сорняки. Двудольные сорняки включают, помимо прочего, сорняки следующих родов:

Sinapis (горчица), *Lepidium* (клоповник), *Galium* (подмаренник), *Stellaria* (звездчатка), *Matricaria* (ромашка), *Anthemis* (пупавка), *Galinsoga* (галинсoga), *Chenopodium* (марь), *Urtica* (крапива), *Senecio* (крестовник), *Amaranthus* (щирица), *Portulaca* (портулак), *Xanthium* (дурнишник), *Convolvulus* (вьюнок), *Ipomoea* (ипомея), *Polygonum* (горец), *Sesbania* (сесбания), *Ambrosia* (амброзия), *Cirsium* (бодяк), *Carduus* (чертополох), *Sonchus* (осот), *Solanum* (паслен), *Rorippa* (жерушник), *Rotala* (ротала), *Lindernia* (линдерния), *Lamium* (яснотка), *Veronica* (вероника), *Abutilon* (канатник), *Emex* (эмекс), *Datura* (дурман), *Viola* (виола), *Galeopsis* (пикульник), *Papaver* (мак), *Centaurea* (василек), *Trifolium* (клевер), *Ranunculus* (ранункулус) и *Taraxacum* (одуванчик). Однодольные сорняки включают, помимо прочего, сорняки следующих родов: *Echinochloa* (ежовник), *Setaria* (щетинник), *Panicum* (посо), *Digitaria* (росичка), *Phleum* (timoфеевка), *Poa* (мятлик), *Festuca* (овсяница), *Eleusine* (элевсина), *Brachiaria* (брахиария), *Lolium* (плевел), *Bromus* (костер), *Avena* (овес), *Cyperus* (щиперус), *Sorghum* (сорго), *Agropyron* (пырей), *Cynodon* (свиной), *Monochoria* (монохория), *Fimbristylis* (фимбристилис), *Sagittaria* (сагиттария), *Eleocharis* (элеохарис), *Scirpus* (камыш), *Paspalum* (паспалум), *Ischaemum* (исхаемум), *Sphenoclea* (сфеноклея), *Dactyloctenium* (дактилоктениум), *Agrostis* (полевица), *Alopecurus* (лисохвост) и *Apera* (метлица).

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

Термин "растение" используется в широком смысле, так как он подразумевает органический материал и эукариотические организмы, принадлежащие Царству растений, примеры которых включают, но не ограничиваются ими, сосудистые растения, овощи, хлебные злаки, цветы, деревья, травы, кусты, дерн, виноградную лозу, папоротник, мох, грибы и водоросли и т.д., а также клоны, отростки и части растений, используемые для вегетативного размножения (например, побеги, стебли, побеги, корневище, подземные корни, комки, венчики, луковицы, клубнелуковицы, клубни, растения/ткани, полученные при культивировании ткани и т.д.). Термин "растение" также обозначает целое растение, предков и потомство растений и их частей, включая семена, побеги, стебли, листья, корни (включая клубни), цветки, соцветия, плоды, цветоножки, плодоножки, тычинку, пыльник, рыльце, завязь, чашелистик, плодolistик, корневой кончик, корневой чехлик, корневой волосок, листовой волосок, растительное волокно, пыльцевое

зерно, микроспоры, семядолю, гипокотиль, эпикотиль, ксилему, флоэму, паренхиму, эндосперму, клетку-спутник, замыкающую клетку и другие известные органы, ткани и клетки растения, и ткани и органы, где каждый из вышеперечисленного содержит интересующий ген/нуклеиновую кислоту. Термин "растение" также включает клетки растений, суспензионные культуры, ткань каллюсов, эмбрионы, меристемные области, гаметофиты, спорофиты, пыльцу и микроспоры, где каждый из вышеперечисленного содержит интересующий ген/нуклеиновую кислоту.

Растения, в частности, применимые в способах настоящего изобретения, включают все растения, которые относятся к подцарству *Viridiplantae*, в частности, однодольные и двудольные растения, включая кормовые растения или кормовые бобовые культуры, декоративные растения, продовольственные культуры, деревья или кустарники, выбранные из перечня, помимо прочего, включающего

Acer spp., *Actinidia* spp., *Abelmoschus* spp., *Agave sisalana*,

Agropyron spp., *Agrostis stolonifera*, *Allium* spp., *Amaranthus* spp., *Ammophila arenaria*, *Ananas comosus*, *Annona* spp., *Apium graveolens*, *Arachis* spp., *Artocarpus* spp., *Asparagus officinalis*, *Avena* spp. (напр., *Avena sativa*, *Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua* var. *sativa*, *Avena hybrida*), *Averrhoa carambola*, *Bambusa* sp., *Benincasa hispida*, *Bertholletia excelsa*, *Beta vulgaris*, *Brassica* spp. (напр., *Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp. [капуста, масличный рапс, репа масличная]), *Cadaba farinosa*, *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Cannabis sativa*, *Capsicum* spp., *Carex elata*, *Carica papaya*, *Carissa macrocarpa*, *Carya* spp., *Carthamus tinctorius*, *Castanea* spp., *Ceiba pentandra*, *Cichorium endivia*, *Cinnamomum* spp., *Citrullus lanatus*, *Citrus* spp., *Cocos* spp., *Coffea* spp., *Colocasia esculenta*, *Cola* spp., *Corchorus* sp., *Coriandrum sativum*, *Corylus* spp., *Crataegus* spp., *Crocus sativus*, *Cucurbita* spp., *Cucumis* spp., *Cynara* spp., *Daucus carota*, *Desmodium* spp., *Dimocarpus longan*, *Dioscorea* spp., *Diospyros* spp., *Echinochloa* spp., *Elaeis* (напр., *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*), *Eleusine coracana*, *Eragrostis tef*, *Erianthus* sp., *Eriobotrya japonica*, *Eucalyptus* sp., *Eugenia uniflora*, *Fagopyrum* spp., *Fagus* spp., *Festuca arundinacea*, *Ficus carica*, *Fortunella* spp., *Fragaria* spp., *Ginkgo biloba*, *Glycine* spp. (напр., *Glycine max*, *Soja hispida* или *Soja max*), *Gossypium hirsutum*, *Helianthus* spp. (напр., *Helianthus annuus*), *Hemerocallis fulva*, *Hibiscus* spp., *Hordeum* spp. (напр., *Hordeum vulgare*), *Ipomoea batatas*, *Juglans* spp., *Lactuca sativa*, *Lathyrus* spp., *Lens culinaris*, *Linum usitatissimum*, *Litchi chinensis*, *Lotus* spp., *Luffa acutangula*, *Lupinus* spp., *Luzula sylvatica*, *Lycopersicon* spp. (напр., *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Lycopersicon pyriforme*), *Macrotyloma* spp., *Malus* spp., *Malpighia emarginata*, *Mammea americana*, *Mangifera indica*, *Manihot* spp., *Manilkara zapota*, *Medicago sativa*, *Melilotus* spp., *Mentha* spp., *Miscanthus sinensis*, *Momordica* spp., *Morus nigra*, *Musa* spp., *Nicotiana* spp., *Olea* spp., *Opuntia* spp., *Ornithopus* spp., *Oryza* spp. (напр., *Oryza sativa*, *Oryza latifolia*), *Panicum miliaceum*, *Panicum virgatum*, *Passiflora edulis*, *Pastinaca sativa*, *Pennisetum* sp., *Persea* spp., *Petroselinum crispum*, *Phalaris arundinacea*, *Phaseolus* spp., *Phleum pratense*, *Phoenix* spp., *Phragmites australis*, *Physalis* spp., *Pinus* spp., *Pistacia vera*, *Pisum* spp., *Poa* spp., *Populus* spp., *Prosopis* spp., *Prunus* spp., *Psidium* spp., *Punica granatum*, *Pyrus communis*, *Quercus* spp., *Raphanus sativus*, *Rheum rhabarbarum*, *Ribes* spp., *Ricinus*

communis, Rubus spp., Saccharum spp., Salix sp., Sambucus spp., Secale cereale, Sesamum spp., Sinapis sp., Solanum spp. (напр., Solanum tuberosum, Solanum integrifolium или Solanum lycopersicum), Sorghum bicolor, Spinacia spp., Syzygium spp., Tagetes spp., Tamarindus indica, Theobroma cacao, Trifolium spp., Tripsacum dactyloides, Triticosecale rimpai, Triticum spp. (напр., Triticum aestivum, Triticum durum, Triticum turgidum, Triticum hybernum, Triticum macha, Triticum sativum, Triticum monococcum или Triticum vulgare), Tropaeolum minus, Tropaeolum majus, Vaccinium spp., Vicia spp., Vigna spp., Viola odorata, Vitis spp., Zea mays, Zizania palustris, Ziziphus spp.,

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

В целом под термином "гербицид" в настоящем изобретении подразумевается ингредиент, который уничтожает растение, контролирует или каким-либо способом препятствует росту растения. Предпочтительным количеством или концентрацией гербицида является "эффективное количество" или "эффективная концентрация". Под "эффективным количеством" или "эффективной концентрацией" подразумевается количество или концентрация, соответственно, достаточные для уничтожения или препятствования росту подобного, дикого типа, растения, ткани растения, клетки растения или клетки-хозяина, но это количество не уничтожает или не препятствует таким же образом росту растений, тканей растения, клеток растения и клетки-хозяина, стойких к гербицидам, которые описаны в настоящем изобретении. Также эффективное количество гербицида - это количество, которое обычно используется в системах сельскохозяйственного производства для уничтожения интересующих сорняков.

Специалистам хорошо известно такое количество. Гербициды, применимые по настоящему изобретению, проявляют свою активность при непосредственном нанесении на растение или на место произрастания растения на любом этапе роста или до его насаждения или прорастания. Эффект зависит от вида растения, этапа роста, применяемые параметры раствора и размер капель при опрыскивании, размера частиц твердых компонентов, внешних условий во время использования, использованного специфического состава, вспомогательных средств и носителей, типа почвы и т.п., а также количества используемых химических веществ. Эти и другие факторы можно регулировать способом, известным специалистам, чтобы вызвать селективную или неселективную активность гербицидов. Как правило могут применяться варианты обработки гербицидами PPI (предварительное внесение в растение), PPSA (последующее внесение в поверхность растения), до всхода или после всхода. Для получения максимального контроля над сорняками после всходовой обработке, как правило, подвергаются нежелательные растения только что взойшли.

Под растениями, "устойчивыми к гербициду" или "стойкими к гербициду", подразумевается то, что эти растения устойчивы или стойки по меньшей мере к одному гербициду, который в данном количестве обычно уничтожает обычные или дикие растения или препятствует их росту. Специалисту в данной области известно количество гербицида, обычно вызывающее задержку роста нестойкого растения, и он может легко его определить. В примерах указано количество, рекомендованное производителями для применения. Максимальный уровень является примером такого количества гербицида, которое ведет к задержке роста растения, не обладающего устойчивостью. В рамках настоящего изобретения термины "устойчивый к гербициду" и "обладающий стойкостью к гербициду" используются взаимозаменяемо; подразумевается, что они имеют одинаковое значение и эквивалентный объем. Аналогичным образом в рамках настоящего изобретения термины "устойчивость к гербициду" и "стойкость к гербициду" используются взаимозаменяемо; подразумевается, что они имеют одинаковое значение и эквивалентный объем. Аналогичным образом в рамках настоящего изобретения термины "устойчивый" и "стойкий" используются взаимозаменяемо; подразумевается, что они имеют одинаковое значение и эквивалентный объем.

При использовании по тексту настоящего документа в отношении гербицидов, применимых в различных вариантах осуществления настоящего изобретения, такие термины как гербициды и подобные термины относятся к приемлемым с сельскохозяйственной точки зрения активным ингредиентам (A.I.) гербицида, известным в данной области. Подобным образом, такие термины как фунгицид, нематодцид, пестицид и подобные относятся к другим приемлемым с сельскохозяйственной точки зрения активным ингредиентам, широко применяемым в данной области.

В случае когда такие термины как "гербицидоустойчивый" и "устойчивость к гербицидам" используются в отношении определенного мутантного фермента или полипептида, они обозначают способность такого фермента или полипептида осуществлять свою физиологическую активность в присутствии такого количества А.І. гербицида, которое при нормальных условиях деактивирует или замедляет активность дикой (немутантной) версии указанного фермента или полипептида. С другой стороны, при использовании, в частности, по отношению к ферменту TgIA данный термин относится, в частности, к способности метаболизировать, и тем самым инактивировать гербициды, которые подавляют биосинтез целлюлозы, так называемые ингибиторы биосинтеза целлюлозы (ИБЦ). Под термином "белок TgIA дикого типа или мутированной TgIA, устойчивый к гербициду" или "белок TgIA дикого типа или мутированной TgIA, стойкий к гербициду" подразумевается целлюлоза белок, который проявляет большую активность к метаболизму по сравнению с активностью к метаболизму белка TgIA дикого типа в присутствии по меньшей мере одного гербицида, который обычно влияет на биосинтез целлюлозы и при концентрации или дозе внесения гербицида обычно подавляет биосинтез целлюлозы. Более того, TgIA активность такого белка TgIA дикого типа или мутированной TgIA, устойчивого или стойкого к гербициду, может быть обозначена в данном документе, как активность TgIA, "устойчивой к гербициду" или "стойкой к гербициду".

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

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

В соответствии с данным документом термин "мутировавший" относится к организму или к его ДНК с изменением(ями) в биомолекулярной последовательности его нативного генетического материала по сравнению с последовательностью генетического материала соответствующего организма или ДНК дикого типа, в котором изменение(я) генетического материала были вызваны и/или выведены человеком. К примерам действий человека для получения мутировавшего организма или ДНК относятся, помимо прочего, обработка химическим мутагеном, таким как EMS, и последующая селекция с использованием гербицидов; или обработка клеток растения рентгеновским излучением и последующая селекция с использованием гербицидов. Любой способ, известный в данной области, может использоваться для получения мутации. Способы получения мутаций могут вызывать мутации в случайных позициях в генетическом материале, либо на определенных участках генетического материала (т.е. могут использоваться техники направленного мутагенеза), такие как использование метода генопластики.

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

отсутствует такой трансгенный материал, однако в которых природный генетический материал мутировал таким образом, что он отличается от материала соответствующего организма или ДНК дикого типа.

В соответствии с данным документом, "дикий тип" или "соответствующее растение дикого типа" обозначает типичную форму организма или его генетический материал, как это обычно происходит, в отличие от, например, мутировавших и/или рекомбинантных форм. Аналогичным образом под "контрольной клеткой" или "похожим, дикого типа, растением, тканью растения, клеткой растения или клеткой-хозяином" подразумевается растение, ткань растения, клетка растения или клетка-хозяин, соответственно, у которых отсутствуют характеристики стойкости к гербицидам и/или особый нуклеотид, что описано в настоящем изобретении. Термин "дикий тип", таким образом, не подразумевает, что растение, ткань растения, клетка растения или другая клетка-хозяин не имеет рекомбинантную ДНК в геноме, и/или не обладает характеристикой стойкости к гербицидам, отличной от тех, которые описаны в настоящем документе.

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

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

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

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

Согласно одному аспекту настоящим изобретением предоставляется растение или часть растения, содержащие полинуклеотид, кодирующий полипептид TrtA дикого типа или мутированной TrtA, при этом экспрессия указанного полинуклеотида придает растению или части растения устойчивость к гербицидам.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения растение предварительно было получено в процессе, включающем рекомбинантную подготовку растения путем введения и сверхэкспрессии трансгена TrtA дикого типа или трансгена мутированной TrtA в соответствии с настоящим изобретением, как описано более подробно далее.

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

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

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

Установлено, что полинуклеотидные молекулы TrtA и полипептиды TrtA изобретения охватывают полинуклеотидные молекулы и полипептиды с нуклеотидной или аминокислотной последовательностью, достаточно идентичной с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1 или с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2. Термин "достаточно идентичный" подразумевает в настоящем документе первую аминокислотную или нуклеотидную последовательность, которая содержит достаточное или минимальное число аминокислотных радикалов или нуклеоти-

дов, идентичных или эквивалентных (например, с похожей боковой цепочкой) второй аминокислотной или нуклеотидной последовательности таким образом, что первая и вторая аминокислотная или нуклеотидная последовательности имеют общий структурный домен и/или общую функциональную активность.

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

Полинуклеотиды и олигонуклеотиды.

Под термином "изолированный полинуклеотид", включая ДНК, РНК или их комбинацию, односпиральные или двухспиральные, в смысловой или натисмысловой ориентации или в их сочетании, дцРНК или иные варианты, следует понимать полинуклеотид, который, по крайней мере, частично, отделен от последовательностей полинуклеотидов, с которыми он связан или к которым привязан в своем естественном состоянии. Предпочтительно изолированный полинуклеотид должен быть по меньшей мере на 60%, более предпочтительно по меньшей мере на 75% и наиболее предпочтительно на 90% свободен от других компонентов, с которыми он обычно связан в природе. Специалистам в данной области известно, что изолированный полинуклеотид может быть экзогенным и присутствовать, например, в трансгенном организме, которые в естественных условиях не содержит данный полинуклеотид. Кроме того, термины "полинуклеотид", "последовательность нуклеиновой кислоты", "нуклеотидная последовательность", "нуклеиновая кислота", "молекула нуклеиновой кислоты" взаимозаменяемы и подразумевают в настоящем документе нуклеотиды, рибонуклеотиды и дезоксирибонуклеотиды или их комбинацию, в полимерной неразветвленной форме любой длины.

Термин "нуклеиновая кислота мутированной TgIA" относится к TgIA-нуклеиновой кислоте, которая имеет последовательность, мутировавшую из нуклеиновой кислоты TgIA дикого типа, и которая придает повышенную устойчивость к гербицидам растению, в котором происходит ее экспрессия. Кроме того, термин "мутированная меламина диаминаза (мутированная TgIA)" подразумевает замещение аминокислоты первичной последовательности дикого типа № 2 или ее вариантом, производном, гомологом, ортологом или паралогом, другой аминокислотой. Выражение "аминокислота" будет использоваться ниже для определения аминокислоты, которая заменяется другой аминокислотой, обозначая тем самым место мутации в первичной последовательности белка.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения нуклеотидная последовательность TgIA включает последовательность SEQ ID NO: 1 или ее вариант или производное.

Кроме того, для специалистов в данной области будет понятно, что TgIA нуклеотидные последовательности включают гомологи, паралоги и ортологи SEQ ID NO: 1 согласно определению в настоящем документе.

Термин "вариант" в отношении последовательности (например, полипептидной последовательности или нуклеотидной последовательности, такой, например, как регулирующая транскрипцию нуклеотидная последовательность по настоящему изобретению) подразумевает существенно схожие последовательности. Для нуклеотидных последовательностей, включающих открытую рамку считывания варианты подразумевают те последовательности, которые вследствие дегенерации генетического кода, кодируют идентичную аминокислотную последовательность нативного белка. Такие природные аллельные варианты могут быть идентифицированы при помощи известных методов молекулярной биологии таких как, например, метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) и метод гибридизации. Вариантные нуклеотидные последовательности также включают нуклеотидные последовательности, полученные синтетическим методом, такие как последовательности, образованные, например, путем направленного мутагенеза и для открытых рамок считывания кодируют нативный белок, содержащий последовательность SEQ ID NO: 2, а также последовательности, кодирующие полипептид с аминокислотными замещениями относительно нативного белка, например, мутированная TgIA по настоящему изобретению, согласно описанию в настоящем документе. В целом варианты нуклеотидной последовательности по изобретению будут иметь по меньшей мере 30, 40, 50, 60 и до 70%, например предпочтительно 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78 и до 79%, в целом по меньшей мере 80%, например 81-84%, по меньшей мере 85%, например 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93%, по меньшей мере 94, 95, 96, 97%, до 98 и 99% идентичности последовательности по отношению к нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1. Процентная идентичность последователь-

ности полинуклеотида определяется с использованием GAP-анализа (Нидлман и Вунш, 1970) (программа GCG) со штрафом на внесение делеции=5 и штрафом на продолжение делеции=0,3. Если не указано иное, искомая последовательность имеет длину по меньшей мере 45 нуклеотидов, а также с помощью GAP-анализа выравниваются две последовательности на участке длиной по меньшей мере 45 нуклеотидов. Предпочтительно искомая последовательность имеет длину по меньшей мере 150 нуклеотидов, а также с помощью GAP-анализа выравниваются две последовательности на участке длиной по меньшей мере 150 нуклеотидов. Более предпочтительно искомая последовательность имеет длину по меньшей мере 300 нуклеотидов, а также с помощью GAP-анализа выравниваются две последовательности на участке длиной по меньшей мере 300 нуклеотидов. Еще более предпочтительно с помощью GAP-анализа выравниваются две последовательности по всей их длине.

Полипептиды.

Под термином "существенно очищенный полипептид" или "очищенный" полипептид следует понимать, что он был отделен от одного или более липидов, нуклеиновых кислот, других полипептидов или других молекул-загрязнителей, с которыми он связан в естественных условиях. Предпочтительно чтобы существенно очищенный полипептид был по меньшей мере на 60%, более предпочтительно по меньшей мере на 75% и наиболее предпочтительно на 90% свободен от других компонентов, с которыми он обычно связан в природе. Специалистам в данной области известно, что в качестве очищенного полипептида может выступать полипептид, полученный рекомбинантным способом. Термины "полипептид" и "белок" в целом взаимозаменяемы при их использовании в настоящем документе и относятся к одиночной цепи полипептидов, которая может изменяться, а может и не изменяться при добавлении неаминокислотных групп. Предполагается, что такие цепи полипептидов могут соединяться с другими полипептидами или белками или иными молекулами, такими как кофакторы. Термины "белки" и "полипептиды" при использовании в настоящем документе также включают варианты, мутантов, модификации, аналоги и/или производные полипептидов по изобретению согласно описанию в настоящем документе.

Процентная идентичность полипептида определяется с использованием.

GAP-анализа (Нидлман и Вунш, 1970) (программа GCG), в рамках которого пробел создания разрыва=5, а штраф на продолжение делеции=0,3. Искомая последовательность длиной по меньшей мере 25 аминокислот, а также GAP-анализ приводят в соответствие две последовательности на участке длиной минимум 25 аминокислот. Более предпочтительно искомая последовательность длиной по меньшей мере 50 аминокислот, а также GAP-анализ приводят в соответствие две последовательности на участке длиной минимум 50 аминокислот. Более предпочтительно искомая последовательность длиной по меньшей мере 100 аминокислот, а также GAP-анализ приводят в соответствие две последовательности на участке длиной минимум 100 аминокислот. Еще более предпочтительно искомая последовательность длиной по меньшей мере 250 аминокислот, а также GAP-анализ приводят в соответствие две последовательности на участке длиной минимум 250 аминокислот. Еще более предпочтительно GAP-анализ приводит в соответствие две последовательности по всей их длине.

Относительно описанного полипептида будет предпочтительно, чтобы значения процентной идентичности больше тех, что указаны выше, включали предпочтительные варианты осуществления изобретения. Таким образом, в соответствующих случаях, учитывая цифры минимальной процентной идентичности, предпочтительно, чтобы TrIA-полипептид по изобретению содержал аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 40%, более предпочтительно по меньшей мере 45%, более предпочтительно по меньшей мере 50%, более предпочтительно по меньшей мере 55%, более предпочтительно по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 65%, более предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно по меньшей мере 99.1%, более предпочтительно по меньшей мере 99.2%, более предпочтительно по меньшей мере 99.3%, более предпочтительно по меньшей мере 99.4%, более предпочтительно по меньшей мере 99.5%, более предпочтительно по меньшей мере 99.6%, более предпочтительно по меньшей мере 99.7%, более предпочтительно по меньшей мере 99.8% и еще более предпочтительно по меньшей мере 99.9% идентичности последовательности SEQ ID NO: 2.

Под "вариантом" полипептида подразумевается полипептид, полученный из белка SEQ ID NO: 2 путем удаления (т.н. усечение) или добавления одной или более аминокислот к N-концевой и/или C-концевой области нативного белка; путем удаления (т.н. усечение) или добавления одной или более аминокислот на одном или более участках нативного белка; или путем замены одной или более аминокислот на одном или более участках нативного белка. Такие варианты могут быть получены, например, в результате генетического полиморфизма или манипуляций, совершенных человеком. Способы таких манипуляций хорошо известны специалистам.

"Производные" белка включают пептиды, олигопептиды, полипептиды, белки и ферменты, имеющие

аминокислотные замещения, делеции и/или вставки относительно интересующего немодифицированного белка и имеющие схожую биологическую и функциональную активность, как у немодифицированного белка, из которого они получены. Таким образом, за исключением случаев, когда специально указано иное, в объем настоящего изобретения входят функциональные варианты и фрагменты полипептидов TgIA, и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие их, вне зависимости от происхождения указанного полипептида и вне зависимости от того, встречается ли он в естественных условиях. Для определения функциональности полипептида TgIA могут использоваться различные анализы. Например, может проводиться анализ функционального варианта или фрагмента полипептида TgIA для определения его способности передавать гербицидам детоксикацию. Например, степень детоксификации гербицидов может быть определена как скорость катализации, достаточная для того, чтобы обеспечить измеримое увеличение устойчивости к гербицидам в растении или части растения, содержащих рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий вариант или фрагмент полипептида TgIA, при этом в растении или части растения осуществляется экспрессия указанного варианта или фрагмента до приблизительно 0,5% в качестве примера: приблизительно 0,05-0,5%, приблизительно 0,1-0,4% и приблизительно 0,2-0,3% от общего количества клеточного белка по сравнению с обработанным аналогичным образом контрольным растением, в котором не осуществляется экспрессия указанного варианта или фрагмента.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения полипептид TgIA дикого типа или мутированной TgIA, является функциональным вариантом или фрагментом меламиндиаменазы, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, при этом функциональный вариант или фрагмент имеет по меньшей мере около 80% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 2.

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

"Гомологи" белка включают пептиды, олигопептиды, полипептиды, белки и ферменты, имеющие аминокислотные замещения, делеции и/или вставки относительно интересующего немодифицированного белка и имеющие схожую биологическую и функциональную активность, как у немодифицированного белка, из которого они получены.

Кроме того, специалист сможет также оценить то, что в нуклеотидные последовательности по изобретению могут быть введены изменения путем мутации, в результате чего будет изменена аминокислотная последовательность кодируемых белков без изменения биологической активности белков. Так, например, изолированная молекула полинуклеотида, кодирующая полинуклеотид с мутированной TgIA, имеет аминокислотную последовательность, которая отличается от той, что предусмотрена в SEQ ID NO: 2, может создаваться путем выполнения одного или более нуклеотидных замещений, добавлений или удалений в соответствующую нуклеотидную последовательность, при котором одно или несколько аминокислотных замещений, добавлений или удалений будут выполнены в кодированном белке. Мутации могут вводиться с применением стандартных методов, таких как сайт-специфичный и ПЦР-опосредованный мутагенез. Такие вариантные нуклеотидные последовательности также входят в объем настоящего изобретения. Например, предпочтительно консервативные аминокислотные замены могут выполняются в одном или более прогнозных заменимых аминокислотных остатках. "Заменимый" аминокислотный остаток - это остаток в белковой последовательности дикого типа, который может быть изменен без изменения биологической активности, в то время как "незаменимый" аминокислотный остаток - это остаток необходимый для биологической активности.

Удаление относится к устранению одной или более аминокислот из белка.

Термин "вставка" относится к одному или более аминокислотному остатку, который вводят в установленное место в белке. Вставки могут включать слияния N- и/или С-конца, а также вставки единичных или множественных аминокислот внутрь последовательности. Обычно, введения внутри аминокислотной последовательности будут меньше, чем объединения N- и С-конца, порядка примерно от 1 до 10 радикалов. Примеры белков или пептидов слияний N- и С-конца включают связывающий или активационный домен транскрипционного активатора, как использовано в двухгибридной системе дрожжей, фаговых белках оболочки, гистидин-6-маркере, глутатион S-трансфераза-маркере, белке А, связывающем мальтозу белке, дигидрофолат редуктазе, Tag-100 эпитопе, с-мик эпитопе, FLAG®-эпитопе, lacZ, CMP (калмодулин-связывающий белок), HA эпитопе, белок С эпитопе и VSV эпитопе.

Замещение означает замену аминокислот белков другими аминокислотами со схожими характеристиками (такими как схожая гидрофобность, гидрофильность, антигенность, склонность к формированию или разрушению α -спиральных или β -пластинчатых структур). Замещаются обычно аминокислоты единичными радикалами, но могут группироваться в зависимости от функциональных ограничений, на-

ложенных на полипептид, и могут варьироваться от 1 до 10 аминокислот; вставки обычно составляют от 1 до 10 радикалов аминокислот. Под "консервативным аминокислотным замещением" понимается замещение, в котором аминокислотный радикал заменяется на аминокислотный радикал, имеющий схожую боковую цепочку. Семейства аминокислотных радикалов, имеющих схожие боковые цепочки, были описаны в литературе по данной теме. Данные семейства включают аминокислоты с боковыми цепочками оснований (например, лизин, аргинин, гистидин), боковыми цепочками кислот (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепочки (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистин), неполярные боковые цепочки (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепочки (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепочки (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Такие замены не осуществляются для консервативных аминокислотных остатков или для аминокислотных остатков, находящихся в консервативном мотиве. Таблицы консервативных замещений хорошо известны специалистам (например, см. Creighton (1984), *Proteins*. W.H. Freeman and Company (Eds)).

Аминокислотные замещения, делеции и/или вставки могут осуществляться с использованием технологий синтеза пептидов, хорошо известных специалистам, например, пептидный синтез на твердой фазе, либо с помощью манипуляции с рекомбинантной ДНК. Методы манипуляции с последовательностями ДНК для осуществления замещения, делеции и/или вставки вариантов белков, хорошо известны в технологии. Например, методы создания мутантов путем замещений на predetermined сайтах ДНК известны специалистам и включают M13 мутагенез, T7-Gen in vitro мутагенез (USB, Cleveland, OH), сайт-специфический мутагенез по методу QuickChange (Stratagene, San Diego, CA), ПЦР-опосредованный сайт-специфический мутагенез или другие протоколы сайт-специфического мутагенеза.

"Производные" включают пептиды, олигопептиды, полипептиды, которые по сравнению с аминокислотной последовательностью природной формы белка, такого как интересующий белок, могут включать аминокислотные замещения с неестественно образующимися аминокислотными радикалами, либо присоединения неестественно образующихся аминокислотных радикалов. "Производные" белка также включают пептиды, олигопептиды, полипептиды, которые включают природные измененные (гликозилированные, ацилированные, пренилированные, фосфорилированные, миристоилированные, сульфатированные и др.) или неестественно измененные аминокислотные радикалы по сравнению с аминокислотной последовательностью природной формы полипептида. Производное может также содержать один или более неаминокислотный заместитель или присоединение, по сравнению с аминокислотной последовательностью, из которой оно получено, например, молекулу репортер или другой лиганд, ковалентно или не ковалентно связанный с аминокислотной последовательностью, такой как молекула репортер, которая связана для облегчения ее обнаружения, и неестественно образованные аминокислотные остатки, родственные аминокислотной последовательности природного белка. Кроме того, "производные" также включают слияния природной формы белка с маркерными пептидами, такими как FLAG, HIS6 или тиредоксин (см. Terpe, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60, 523-533, 2003).

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

Варианты, ортологи и паралоги последовательности SEQ ID NO: 2, охваченные настоящим изобретением, показаны, но не сводятся к полипептидам, включающим SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или 31.

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

Термин "домен" относится к набору аминокислот, которые являются консервативными на определенных позициях в выравнивании последовательностей эволюционно родственных белков. В то время как аминокислоты на других позициях могут различаться между гомологами, аминокислоты, являющиеся крайне консервативными в конкретных позициях, указывают на аминокислоты, которые вероятно имеют необходимую структуру, стабильность или функцию белка. Они идентифицируются по высокой степени консерватизма в выравниваемых последовательностях семейства белковых гомологов и могут использоваться в качестве идентификаторов для определения, принадлежит ли данный полипептид к ранее идентифицированному семейству полипептидов.

Термин "мотив" или "согласованная последовательность" относится к короткому консервативному участку в последовательности эволюционных белков. Часто мотивы - это особо сохраненные части доменов, могут включать только часть домена или находиться вне консервативного домена (если все аминокислоты мотива оказываются вне данного домена).

Для определения доменов существует специализированные базы данных, например SMART (Schultz et al. (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95, 5857-5864; Letunic et al. (2002), *Nucleic. Acids. Res.*, 30, 242-244), InterPro (Mulder et al. (2003), *Nucl. Acids. Res.*, 31, 315-318), Prosite (Bucher and Bairoch

(1994), Универсальная графическая структура мотивов биомолекулярных последовательностей и ее значение в толковании автоматической последовательности (A generalized profile syntax for biomolecular sequences motifs and its function in automatic sequence interpretation). (In) ISMB-94; Материалы 2-й Международной Конференции по Интеллектуальным Системам для Молекулярной Биологии (Proceedings 2nd International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology). Altman R., Brutlag D., Karp P., Lathrop R., Searls D., изд., с. 53-61, AAAI Press, Menlo Park; Hulo et al., Nucl. Acids. Res., 32:D134-D137, (2004)) или Pfam (Bateman et al., Nucleic Acids Research, 30(1):276-280 (2002)). Набор средств для *in silico* анализа белковых последовательностей доступен на сервере по протеомике ExPASy (Шведский институт биоинформатики (Gasteiger et al., ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, Nucleic. Acids. Res., 31:3784-3788(2003)). Домены или мотивы могут определяться с помощью стандартных техник, таких как выравнивание последовательностей.

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

Белки по изобретению могут быть модифицированы различными способами, включая аминокислотные замены, делеции, усечения и вставки. Способы таких манипуляций хорошо известны специалистам. Например, варианты аминокислотных последовательностей могут быть получены путем мутаций в ДНК. Методы мутагенеза и изменения нуклеотидных последовательностей хорошо известны специалистам. См., например, Kunkel (1985), PNAS, 82:488-492; Kunkel et al. (1987), Methods in Enzymol., 154:367-382; патент США № 4873192; Walker and Gaastra, изд. (1983), Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, New York) и ссылки, указанные в данных документах. Указания в отношении соответствующих аминокислотных замен, которые не влияют на биологическую активность интересующего белка, можно найти в модели Dayhoff et al. (1978), Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), который включен в настоящий документ посредством ссылки. Предпочтительными могут быть консервативные замены, например замена одной аминокислоты другой аминокислотой с аналогичными свойствами.

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

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

Соответственно еще одна задача настоящего изобретения относится к полипептиду TrtA, который содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, ключевые аминокислотные радикалы которых замещаются любыми другими аминокислотами.

Для специалистов будет понятно, что аминокислоты, расположенные близко к позициям указанных далее аминокислот, также могут быть замещены. Таким образом, в другом варианте осуществления изобретения

брения вариант SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог включает мутированную TgIA, и чем аминокислота ± 3 , ± 2 или ± 1 аминокислотные позиции из ключевой аминокислоты замещается любой другой аминокислотой.

С помощью методов, хорошо известных специалистам, можно создать очень характерный паттерн последовательности, с помощью которого можно осуществлять поиск других вариантов мутированных TgIA с желаемой активностью.

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

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

Таким образом, в особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения вариант или производная мутированной TgIA относится к полипептиду TgIA, включающему последовательность SEQ ID NO: 2, его ортологу, паралогу или гомологу, где аминокислотная последовательность отличается от аминокислотной последовательности полипептида TgIA дикого типа в одной или более позициях, соответствующих следующим позициям последовательности SEQ ID NO: 2: 70, 71, 88, 91, 92, 96, 126, 128, 155, 157, 167, 220.

Примеры различий в данных позициях аминокислот включают, помимо прочего, один или несколько из следующих:

- аминокислота, соответствующая позиции 70, не является аспарагином;
- аминокислота, соответствующая позиции 71, не является глутамином;
- аминокислота, соответствующая позиции 88, не является лейцином;
- аминокислота, соответствующая позиции 91, не является валином,
- аминокислота, соответствующая позиции 92, не является лейцином;
- аминокислота, соответствующая позиции 96, не является глутамином;
- аминокислота, соответствующая позиции 126, не является аспарагином;
- аминокислота, соответствующая позиции 128, не является аспарагиновой кислотой;
- аминокислота, соответствующая позиции 155, не является метионином;
- аминокислота, соответствующая позиции 157, не является фенилаланином;
- аминокислота, соответствующая позиции 167, не является тирозином;
- аминокислота, соответствующая позиции 220, не является аланином.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фермент мутированной TgIA, включающий последовательность SEQ ID NO: 2, ее ортолог, паралог или гомолог, содержит один или несколько следующих:

В другом предпочтительном варианте осуществления мутированная TgIA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которой аминокислота, соответствующая позиции 70, представляет собой Ala, Ile, Leu, Pro.

В другом предпочтительном варианте осуществления мутированная TgIA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которой аминокислота, соответствующая позиции 71, представляет собой Leu, Ile.

В другом предпочтительном варианте осуществления мутированная TgIA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которой аминокислота, соответствующая позиции 70, представляет собой Ile, Ala, Leu, Pro, Ser, и аминокислота, соответствующая позиции 71, представляет собой Leu, Ile.

В другом предпочтительном варианте осуществления мутированная TgIA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которой аминокислота, соответствующая позиции 70, представляет собой Ile, и аминокислота, соответствующая позиции 71, представляет собой Leu.

В другом предпочтительном варианте осуществления мутированная TgIA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которой аминокислота, соответствующая позиции 70, представляет собой Ile, и аминокислота, соответствующая позиции 71, представляет собой Ile.

В другом предпочтительном варианте осуществления мутированная TgIA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которой аминокислота,

ность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которой аминокислота, соответствующая позиции 128, представляет собой Ala.

В другом предпочтительном варианте осуществления мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которой аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Val, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Ile, Leu, Val.

В другом предпочтительном варианте осуществления мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которой аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Val, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Ile.

В другом предпочтительном варианте осуществления мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которой аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Val, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Leu.

В другом предпочтительном варианте осуществления мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которой аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Val, и аминокислота, соответствующая позиции 157, представляет собой Val.

В другом предпочтительном варианте осуществления мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которой аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Val, и аминокислота, соответствующая позиции 70, представляет собой Pro.

В другом предпочтительном варианте осуществления мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которой аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Val, и аминокислота, соответствующая позиции 71, представляет собой Leu.

В другом предпочтительном варианте осуществления мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которой аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Val, и аминокислота, соответствующая позиции 96, представляет собой Thr, Met, Cys.

В другом предпочтительном варианте осуществления мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которой аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Val, и аминокислота, соответствующая позиции 96, представляет собой Thr.

В другом предпочтительном варианте осуществления мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которой аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Val, и аминокислота, соответствующая позиции 96, представляет собой Met.

В другом предпочтительном варианте осуществления мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которой аминокислота, соответствующая позиции 155, представляет собой Val, и аминокислота, соответствующая позиции 96, представляет собой Cys.

В другом предпочтительном варианте осуществления мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которой аминокислота, соответствующая позиции 167, представляет собой Ser.

В другом предпочтительном варианте осуществления мутированная TriA содержит последовательность SEQ ID NO: 2, ее вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог, в которой аминокислота, соответствующая позиции 220, представляет собой Gly.

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

Другая задача настоящего изобретения относится к способу идентификации нуклеотидной последовательности, кодирующей мутированную TriA, которая является стойкой или устойчивой к гербициду, при этом указанный способ включает

- а) получение библиотеки нуклеиновых кислот, кодирующих мутированную TriA;
- б) скрининг популяции полученных нуклеиновых кислот, кодирующих мутированную TriA, путем экспрессии каждой указанной нуклеиновой кислоты в клетке или растении и обработку этой клетки или растения гербицидом;
- в) сравнение уровней устойчивости к гербицидам, которые получены из данной популяции нуклеи-

новых кислот, кодирующих мутированную TrtA, с уровнями устойчивости к гербициду, которые получены из контрольной нуклеиновой кислоты, кодирующей TrtA;

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

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

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

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

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

Стойкость или устойчивость может быть определена путем получения трансгенного растения или клетки-хозяина, предпочтительно клетки растения с последовательностью нуклеиновой кислоты из библиотеки на этапе a), и путем сравнения этого трансгенного растения с контрольным растением или клеткой-хозяином, предпочтительно клеткой растения.

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

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

В другом варианте осуществления изобретения, возможные аминокислоты трансформируются в растительный материал для получения трансгенного растения, который регенерируется в морфологически нормальные плодоносные растения, у которых затем измеряют дифференциальную устойчивость к выбранным гербицидам согласно описанию в разделе "Примеры" выше. Специалистам хорошо известны многие подходящие методы трансформации, в которых используются маркеры отбора, такие как канамидин, бинарные векторы, такие как векторы, полученные из агробактерии и регенерации растения, на-

пример, из листовых дисков табака. Дополнительно, контрольная популяция растений таким же образом трансформируется нуклеиновой кислотой, экспрессирующей контрольную TgIA. Среднее значение и распределение уровней устойчивости к гербициду, характеризующих результаты первичной трансформации растения или его потомства, на которое влияют гербициды, описанное выше, рассчитывают обычным способом, учитывая повреждение растения, симптомы меристемного отбеливания и т.д., при различных концентрациях гербицидов. Эти данные могут быть выражены в виде, например, значений GR50, полученных из кривой зависимости "доза-эффект", где значение дозы отмечается на оси абсцисс, а на оси ординат отмечаются "процент погибших растений", "эффект гербицида", "количество молодых всходов" и т.д., где увеличение значений GR50 соответствует повышению уровня врожденной устойчивости экспрессированной TgIA. Гербициды можно применять до всхода растений или после.

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

В предпочтительном варианте осуществления изобретения кодирующая мутированная TgIA является вариантом последовательности SEQ ID NO: 2, который включает одну или несколько из следующих:

- аминокислота, соответствующая позиции 70, не является аспарагином;
- аминокислота, соответствующая позиции 71, не является глутамином;
- аминокислота, соответствующая позиции 88, не является лейцином;
- аминокислота, соответствующая позиции 91, не является валином;
- аминокислота, соответствующая позиции 92, не является лейцином;
- аминокислота, соответствующая позиции 96, не является глутамином;
- аминокислота, соответствующая позиции 126, не является аспарагином;
- аминокислота, соответствующая позиции 128, не является аспарагиновой кислотой;
- аминокислота, соответствующая позиции 155, не является метионином;
- аминокислота, соответствующая позиции 157, не является фенилаланином;
- аминокислота, соответствующая позиции 167, не является тирозином;
- аминокислота, соответствующая позиции 220, не является аланином.

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

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

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

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

В еще одном варианте осуществления изобретения настоящим изобретением предоставляется клетка растения или клетка, способная к регенерации растения, содержащего, по меньшей мере, в некоторых своих клетках полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растений, при этом промотор способен экспрессировать полипептид TgIA дикого типа или мутированной TgIA, кодируемый указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида TgIA дикого типа или мутированной TgIA придает указанному растению устойчивость к гербицидам, при этом указанная клетка растения содержит рекомбинантный полинуклеотид, функционально связанный с промотором.

В соответствии с другими вариантами осуществления изобретения настоящим изобретением пре-

доставляется клетка растения, содержащая полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растения, при этом промотор способен экспрессировать полипептид TgIA дикого типа или мутированной TgIA, кодируемый указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида TgIA дикого типа или мутированной TgIA придает указанной клетке устойчивость к гербицидам.

В еще одном варианте осуществления изобретения изобретение относится к клетке растения, трансформированной нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид с мутированной TgIA в соответствии с настоящим изобретением, причем экспрессия нуклеиновой кислоты в клетке растения приводит к повышению стойкости или устойчивости к гербициду по сравнению с клеткой растения дикого типа. Предпочтительно нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид с мутированной TgIA, содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

- a) полинуклеотида, как показано в SEQ ID NO: 1, или его варианта или производного;
- b) полинуклеотида, кодирующего полипептид, как показано в SEQ ID NO: 2, или их вариант или производное;
- c) полинуклеотида, содержащего по меньшей мере 60 непрерывных нуклеотидов, любых из пунктов a) или b); и
- d) полинуклеотида, смежного с полинуклеотидом, любым из пунктов a)-c).

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

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

В еще одном варианте осуществления изобретения изобретение относится к способу получения клетки трансгенного растения с повышенной стойкостью к гербициду по сравнению с клеткой растения дикого типа, включая трансформирование клетки растения кассетой экспрессии полинуклеотидом, функционально связанным с промотором, функционирующим в клетках растений, промотором, который способен экспрессировать полипептид с TgIA дикого типа или с мутированной TgIA, кодируемый полинуклеотидом.

В еще одном варианте осуществления изобретения изобретение относится к способу получения трансгенного растения, включающему

(a) трансформирование клетки растения кассетой экспрессии, содержащей полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растений, при этом промотор способен экспрессировать полипептид TgIA дикого типа или мутированной TgIA, кодируемый указанным полинуклеотидом; и

(b) получение из растительной клетки растения с повышенной стойкостью к гербициду.

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

Термин "экспрессия/экспрессирование" или "экспрессия генов" означает транскрипцию специфического гена или генов или генетической конструкции.

Термин "экспрессия" или "экспрессия генов", в частности, означает транскрипцию специфического гена или генов или генетической конструкции в структурную РНК (рРНК, тРНК) или мРНК с последующей трансляцией последней в белок или без трансляции. Этот процесс включает транскрипцию ДНК и обработку полученного продукта мРНК.

Для получения желаемого эффекта, т.е. растений, устойчивых или стойких к гербицидам, описанным в настоящем изобретении по меньшей мере одна нуклеиновая кислота подвергается сверхэкспрессии методами и способами, известными специалистам в данной области.

Термин "повышенная экспрессия" или "избыточная экспрессия", при использовании по тексту настоящего документа, означает любую форму экспрессии, которая добавляется к уровню экспрессии дикого типа. Методы повышения экспрессии генов или генных продуктов описаны в документах в данной

области и включают, например, сверхэкспрессию, которой способствуют соответствующие промоторы, усилители транскрипции или трансляции. Изолированные нуклеиновые кислоты, которые служат промоторами или усилительными элементами, могут быть введены в соответствующую позицию (обычно против хода транскрипции) негетерологичной формы полинуклеотида для повышающей регуляции экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей целевой полипептид. Например, эндогенные промоторы можно изменить в естественных условиях путем мутации, удаления и/или замещения (см. Kmies, US 5565350; Zarling et al., WO 9322443), или изолированные промоторы можно ввести в клетку растения в надлежащем направлении и на надлежащем расстоянии от гена настоящего изобретения для контролирования экспрессии гена. Если необходима экспрессия полипептида, желательно включить полиаденильный участок 3'-конца на участке, кодирующем полинуклеотид. Полиаденильный участок можно получить из природного гена, набора других растительных генов или Т-ДНК. Добавляемую последовательность 3'-конца можно получить, например, из генов нопалин синтазы или октопин синтазы, или также из другого растительного гена, или менее предпочтительно из любого другого эукариотического гена. Для увеличения количества готовой информации, которая накапливается в цитозоли, к 5' нетранслируемой области (UTR) или кодирующей последовательности частично кодирующей последовательности может быть также добавлена интронная последовательность. Включение связывающего интрона в транскрипционный элемент как в растительные, так и животные экспрессионные конструкторы повысило экспрессию генов на уровнях мРНК и белков до 1000-кратного уровня (Buchman and Berg (1988), *Mol. Cell Biol.*, 8:4395-4405; Callis et al. (1987), *Genes. Dev.*, 1:1183-1200). Такое интронное увеличение генной экспрессии обычно максимально возле 5'-конца транскрипционного элемента. Использование кукурузных интронов Adh1-S интрон 1, 2, и 6, интрон Bronze-1 известны специалистам. Для получения общей информации см.: *The Maize Handbook*, chapter 116, Freeling and Walbot, Изд., Springer, N.Y. (1994).

При необходимости нуклеотидные последовательности могут быть оптимизированы для повышенной экспрессии в трансформированном растении. Например, могут быть предоставлены кодирующие последовательности, которые содержат предпочтительные для растений кодоны для повышения экспрессии в растении. См., например, Campbell and Gowri (1990), *Plant Physiol.*, 1-11 обсуждение использования предпочтительно базовых кодонов. Способы получения предпочтительных для растений генов также известны специалистам из уровня техники. См., например, патенты США № 5380831; и 5436391; и Murray et al. (1989), *Nucleic. Acids. Res.*, 17:477-498, которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

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

Такая кассета экспрессии предусмотрена со множеством сайтов рестрикции для вставки последовательности нуклеиновой кислоты с мутированной TriA/TriA дикого типа, которая будет подвержена транскрипционной регуляции регуляторных участков. Кассета экспрессии может также содержать селективируемый маркерный ген. Кассета экспрессии по настоящему изобретению будет включать по направлению транскрипции от 5'- к 3'-концу область инициации трансляции или транскрипции (т.е. промотор), мутированную TriA/TriA дикого типа, кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и участок терминации транскрипции или трансляции (т.е. участок терминации), являющийся функциональным в растениях. Промотор может быть нативным или аналогическим, инородным или гетерологическим, по отношению к растению-хозяину и/или к нуклеотидной последовательности с мутированной TriA/TriA дикого типа по изобретению. Также промотор может представлять собой природную последовательность или, альтернативно, синтетическую последовательность. Когда промотор является "инородным" или "гетерологическим" по отношению к растению-хозяину, подразумевается, что промотор отсутствует в нативном растении, в которое его ввели. Когда промотор является "инородным" или "гетерологическим" по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты с мутированной TriA/TriA дикого типа В настоящем изобретении подразумевается, что промотор не является нативным или природным промотором для функционально связанной последовательности нуклеиновой кислоты с мутированной TriA/TriA дикого типа по настоящему изобретению. Согласно использованию в настоящем документе, химерный ген содержит кодирующую последовательность, функционально свя-

Эти описания включены в настоящий документ посредством ссылки. Перечень вышеперечисленных маркерных генов не является исчерпывающим. Любой селектируемый маркерный ген может использоваться в настоящем изобретении.

Также известно, что дополнительные модификации последовательностей улучшают генную экспрессию в клетке-хозяине. Они включают удаление последовательностей, кодирующих ложные сигналы полиаденилирования, сигналы участка сплайсирования экзонов и интронов, повторения, подобные транспозонам, и другие так же четко характеризующиеся последовательности, которые могут быть разрушительными по отношению к генной экспрессии. GC-состав последовательности может быть скорректирован до уровней, средних для указанной клетки-хозяина, что рассчитывается с помощью известных генов, экспрессированных в клетке-хозяине. Также при необходимости последовательности могут быть модифицированы таким образом, чтобы в них не было прогнозных шпилечных вторичных мРНК структур. Нуклеотидные последовательности для улучшения генной экспрессии могут также использоваться в векторах экспрессии растения. Они включают, например, интроны кукурузы *Adh1*, интрон гена *Adh1* 1, 2 и 6 (Callis et al., *Genes and Development*, 1:1183-1200, 1987), и ведущие последовательности (W-последовательность) из вируса табачной мозаики (BTM), вируса хлорозной пятнистости кукурузы (ВХПК) и вируса мозаики люцерны (Gallie et al., *Nucleic. Acid. Res.*, 15:8693-8711, 1987 and Skuzeski et al., *Plant Mol. Biol.*, 15:65-79, 1990). Первый интрон из "сморщенного"-1 локуса кукурузы демонстрирует повышение экспрессии генов в конструктах химерного гена. В патентах США № 5424412 и 5593874 описывается использование специфичных интронов в конструктах генной экспрессии, и в Gallie et al. (*Plant Physiol.*, 106:929-939, 1994) также доказывается, что интроны могут использоваться для регулирования генной экспрессии на тканеспецифичной основе. Для дальнейшего улучшения или оптимизации генной экспрессии, векторы экспрессии растения по настоящему изобретению могут также содержать последовательности ДНК с участками MARs (участки прикрепления к матриксу). Растительные клетки, трансформированные такими модифицированными системами экспрессии, могут в дальнейшем проявить сверхэкспрессию или конститутивную экспрессию нуклеотидной последовательности по изобретению.

Изобретение также предоставляет изолированный вектор рекомбинантной экспрессии, включающий кассету экспрессии с нуклеиновой кислотой с мутированной TriA/TriA дикого типа, как описано выше, причем экспрессия вектора в клетке-хозяине приводит к повышению устойчивости к гербициду по сравнению с клеткой-хозяином дикого типа. В данном контексте, термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Одним из видов вектора является "плазида", которая относится к сегментам двухцепочечной петли ДНК, которые можно лигировать в вирусный геном. Еще одним видом вектора является вирусный вектор, где дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они были внесены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальное происхождение репликации, и эписомные векторы, относящиеся к млекопитающим). Другие векторы (например, не эписомные векторы, относящиеся к млекопитающим) интегрируются в геном клетки-хозяина при внесении в клетку-хозяина и реплицируются вместе с геномом-хозяином. Более того, определенные векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы, в данном контексте, называются "векторами экспрессии". Обычно, используемые векторы экспрессии в технологии рекомбинантных ДНК принимают форму плазмид. В настоящем описании изобретения, термин "плазида" и "вектор" являются взаимозаменяемыми, так как плазида чаще всего используется в форме вектора. Тем не менее, изобретение включает и другие формы экспрессионных векторов, такие как вирусные векторы (например, ретровирус с дефективной репликацией, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), выполняющих те же функции.

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

Векторы экспрессии могут также содержать 5'-концевые лидерные последовательности в конструкте экспрессии. Такие лидерные последовательности могут улучшать трансляцию. Трансляционные лидерные последовательности хорошо известны специалистам в данной области и включают лидерные последовательности пикорнавируса, например EMCV лидерные последовательности (некодирующий уча-

сток 5'-конца энцефаломиокардита) (Elroy-Stein et al. (1989), PNAS, 86:6126- 6130); лидерные последовательности потивируса, например, лидер вируса гравировки табака (TEV) (Gallie et al. (1995), Gene, 165(2):233-238), лидерные последовательности вируса карликовой мозаики кукурузы (MDMV) (Virology, 154:9-20), и белок, связывающий тяжелую цепь иммуноглобулина (BiP) (Macejak et al. (1991), Nature, 353:90-94); нетранслируемую лидреную последовательность из вирусного белка мРНК вируса мозаики люцерны (AMV RNA 4) (Jobling et al. (1987), Nature, 325:622-625); лидерную последовательность вируса табачной мозаики (TMV) (Gallie et al. (1989), Molecular Biology of RNA, ed., Cech (Liss, New York), p. 237-256); и лидерную последовательность вируса хлорозной пятнистости кукурузы (MCMV) (Lommel et al. (1991), Virology, 81:382- 385). См. также Della-Cioppa et al. (1987), Plant Physiol., 84:965-968.

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

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

Конститутивные промоторы включают, например, ядерный промотор промотора Rsyn7 и другие конститутивные промоторы, описанные в WO 99/43838 и патент США № 6072050; ядерный промотор CaMV 35S (Odell et al. (1985), Nature, 313:810-812); рисовый актин (Макэлрой (McElroy) et al. (1990), Plant Cell, 2:163-171); убиквитин (Christensen et al. (1989), Plant Mol. Biol., 12:619-632 и Кристенсен (Christensen) и др. (1992), Plant Mol. Biol., 18:675-689); pEMU (Last et al. (1991), Theor. Appl. Genet., 81:581-588); MAS (Velten et al. (1984), EMBO J., 3:2723-2730); ALS промотор (патент США № 5659026), и аналогичные промоторы. Другие конститутивные промоторы включают, например, описанные в патентах США № 5608149; 5608144; 5604121; 5569597; 5466785; 5399680; 5268463; 5608142; и 6177611.

Для нацеливания повышенной экспрессии в определенной ткани растения можно использовать тканеспецифичные промоторы. Такие тканеспецифичные промоторы включают, помимо прочего, промоторы специфичные к листьям, корням, семенам и стеблям. Некоторые примеры тканеспецифичных промоторов описаны, например, в Yamamoto et al. (1997), Plant J., 12(2):255-265; Kawamata et al. (1997), Plant Cell Physiol., 38(7):792-803; Hansen et al. (1997), Mol. Gen. Genet., 254(3):337-343; Russell et al. (1997), Transgenic Res., 6(2):157-168; Rinehart et al. (1996), Plant Physiol., 112(3):1331-1341; Van Camp et al. (1996), Plant Physiol., 112(2):525-535; Canevascini et al. (1996), Plant Physiol., 112(2):513-524; Yamamoto et al. (1994), Plant Cell Physiol., 35(5):773-778; Lam (1994), Results Probl. Cell Differ., 20:181-196; Orozco et al. (1993), Plant Mol Biol., 23(6):1129-1138; Matsuoka et al. (1993), Voc Natl. Acad. Sci. USA, 90(20):9586-9590; и Guevara-Garcia et al. (1993), Plant J., 4(3):495-505. Промоторы при необходимости можно модифицировать таким образом, чтобы экспрессия была меньше.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения промотор является корнеспецифичным промотором.

В одном из частных предпочтительных вариантов осуществления изобретения промотор содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 32.

В некоторых вариантах осуществления целевые нуклеиновые кислоты могут быть направлены в хлоропласт для экспрессии. Таким образом, там, где целевая нуклеиновая кислота вставляется в хлоропласт не напрямую, вектор экспрессии будет также содержать последовательность, направленную на хлоропласт, которая кодирует хлоропластовый транзитный пептид, направляющий целевой генный продукт в хлоропласты. Такие транзитные пептиды хорошо известны специалистам. Относительно последовательностей, нацеленных в хлоропласт, "функционально связанный" означает, что нуклеотидная последовательность, кодирующая транзитный пептид (т.е. последовательность, нацеленная в хлоропласт), связана с целевой кодирующей последовательностью по изобретению так, что две последовательности являются смежными и находятся в одной рамке считывания. 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; Shah et al. (1986), Science, 233:478-481. Например, с аминокислотной последовательностью полипептида TriA по изобретению можно соединить любой известный хлоропластный транзитный пептид путем функционального связывания последовательности, нацеленной в хлоропласт, с 5'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей указанный полипептид TriA.

Последовательности, направленные на хлоропласт, хорошо известны специалистам и включают хлоропластный малый элемент рибулоза-1,5-бифосфат карбоксилазы (Rubisco) (de Castro Silva Filho et al. (1996), Plant Mol. Biol., 30:769-780; Schnell et al. (1991), J. Biol. Chem., 266(5):3335-3342); EPSPS (Archer et al. (1990),

J. Bioenerg. Biomemb., 22(6):789-810); триптофан синтазы (Zhao et al. (1995), J. Biol. Chem., 270(11):6081-6087); пластоцианин (Lawrence et al. (1997), J. Biol. Chem., 272(33):20357-20363); хоризмат синтазы (Schmidt et al. (1993), J. Biol. Chem., 268(36):27447-27457); и флуоресцирующий белок, связывающий хлорофилл a/b (LHBP) (Lamppa et al. (1988), J. Biol. Chem., 263:14996-14999). См. также Фон Хайжне (Von Heijne) и др. (1991), Plant Mol. Biol. Rep., 9:104-126; Clark et al. (1989), J. Biol. Chem., 264:17544-17550; Della-Cioppa et al. (1987), Plant Physiol., 84:965-968; Romer et al. (1993), Biochem Biophys. Res. Commun., 196:1414-1421; и Shah et al. (1986), Science, 233:478-481.

Методы трансформации хлоропластов хорошо известны специалистам. 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. Метод основывается на внедрении с помощью генной пушки ДНК, содержащей селективируемый маркер, и нацеливании ДНК в пластидный геном путем гомологической рекомбинации. Также пластидную трансформацию можно осуществить с помощью трансактивации нефункционирующего трансгена, находящегося в пластиде, путем тканеспецифичной экспрессии РНК полимеразы, закодированной в ядре и направленной в пластиду. О такой системе сообщается в McBride et al. (1994), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:7301-7305.

Целевые нуклеиновые кислоты, которые необходимо направить к хлоропласту, можно оптимизировать для экспрессии в хлоропласте, чтобы оценить разницу при использовании кодона между зародышем растения и этой органеллой. Таким образом, целевые нуклеиновые кислоты можно синтезировать с помощью предпочтительно хлоропластных кодонов. См., например, патент США № 5380831, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

Доступны различные трансформационные векторы и способы трансформации растений. См., например,

- An, G. et al. (1986) Plant Physiol., 81 :301-305;
 Fry, J., et al. (1987) Plant Cell Rep. 6:321-325; Block, M. (1988) Theor. Appl. Genet. 16: 161 -1 1 A; Hinchee, et al. (1990) Stadler. Genet. Symp.2032\2.203-2\2;
 Cousins, et al. (1991) Aust. J. Plant Physiol. 18:481-494; Chee, P. P. and Slightom, J. L. (1992) Gene.1 1 8:255-260; Christou, et al. (1992) Trends. Biotechnol. 10:239-246;
 Halluin, et al. (1992) Bio/Technol. 10:309-314; Dhir, et al. (1992) Plant Physiol. 99:81-88; Casas et al. (1993) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90: 1 1212-1 1216; Christou, P. (1993) In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant; 29P.119-124; Davies, et al. (1993) Plant Cell Rep. 12: 180-183; Dong, J. A. and Mchughen, A. (1993) Plant Sci 91 : 139-148; Franklin, C. I. and Trieu, T. N. (1993) Plant. Physiol. 102: 167; Golovkin, et al. (1993) Plant Sci 90:41-52; Guo Chin Sci Bull. 38:2072-2078; Asano, et al. (1994) Plant Cell Rep. 13; Ayeres N. M. and Park, W. D. (1994) Crit. Rev. Plant. Sci. 13:219-239; Barcelo, et al. (1994) Plant. J. 5:583-592; Becker, et al. (1994) Plant. J. 5:299-307; Borkowska et al. (1994) Acta. Physiol. Plant. 16:225-230; Christou, P. (1994) Agro. Food. Ind. Hi Tech. 5: 17-27; Eapen et al. (1994) Plant Cell Rep. 13:582-586; Hartman, et al. (1994) Bio-Technology 12: 919923; Ritala, et al. (1994) Plant. Mol. Biol. 24:317-325; и Wan, Y. C. and Lemaux, P. G. (1994) Plant Physiol. 104:3748.

В некоторых вариантах осуществления способ по изобретению включает введение в растение конструктора полинуклеотида. Термин "введение" означает внедрение конструктора полинуклеотида в растение таким образом, что конструктор получает доступ к внутренней части клетки растения. Способы по изобретению не зависят от конкретного метода введения конструктора полинуклеотида в растение за исключением того, что введение должно осуществляться таким образом, чтобы конструктор полинуклеотида получал доступ к внутренней части по меньшей мере одной клетки растения. Способы введения конструкторов полинуклеотида в растения известны специалистам и включают, помимо прочего, способы стабильной трансформации, транзиторной трансформации и вирус-опосредованные способы. Термины "введение" и "трансформация" по тексту настоящего документа обозначают здесь перенос экзогенного полинуклеотида в клетку-хозяина, независимо от способа переноса. Ткань растения, способная к дальнейшему клонированию, путем органогенеза либо эмбриогенеза, может быть трансформирована с регенерацией из нее генетического конструктора по настоящему изобретению и целого растения. Выбор определенной ткани будет зависеть от доступных и наиболее подходящих для трансформации определенного вида систем клонирования. Образцы целевых тканей включают листовые диски, пыльцу, зародыши, семядоли, гипокотили, мегагаметофиты, ткани каллусов, существующую меристемную ткань (например, верхушечную меристему, пазушные почки и корневые меристемы) и индуцированную меристемную ткань (например, семядольную меристему и меристему гипокотыля). Полинуклеотид может быть вне-

дрен в клетку-хозяина на время или постоянно и может сохраняться в неизменном виде, например, в виде плазмиды. Либо он может быть интегрирован в главный геном. Полученная трансформированная растительная клетка может использоваться для регенерации трансформированного растения, способами, которые известны специалистам в данной области.

Под термином "стабильная трансформация" подразумевается то, что при введении в растение конструктор полинуклеотида встраивается в геном растения и способен наследоваться его потомками. Под термином "транзистентная трансформация" подразумевается то, что при введении в растение конструктор полинуклеотида не встраивается в геном растения.

Для трансформации растений и клеток растения, нуклеотидные последовательности по изобретению вставляются с использованием стандартных методов в любой известный специалистам вектор, который может использоваться для экспрессии нуклеотидных последовательностей в растении или клетке растения. Выбор вектора зависит от предпочтительного метода трансформации и целевого вида растений, который подвергается трансформации. В одном из вариантов осуществления изобретения кодирующая нуклеотидная последовательность функционально связана растительным промотором, например, с промотором, который известен специалистам как промотор, обеспечивающий высокий уровень экспрессии в клетке растения, и затем этот конструктор вводится в клетку растения, которая подвергается воздействию гербицидов, затем осуществляется регенерация трансформированного растения. В некоторых вариантах осуществления трансформированное растение обладает устойчивостью к такому уровню воздействия гербицидов, который привел бы к гибели или существенному повреждению растения, регенерированного из нетрансформированной клетки. Настоящий способ может применяться к любым видам или культурам растений.

В целом специалистам известны методологии конструирования растительных векторов экспрессии и введения чужеродных нуклеиновых кислот в растение. Например, чужеродные ДНК могут вводиться в растения с использованием опухолееиндуцирующих (Ti) плазмидных векторов. Другие способы, используемые для введения чужеродной ДНК, включают использование PEG-опосредованную трансформацию протопласта, электропорацию, использование микроигл для микроинъекций, и биобаллистику или бомбардировку микрочастицами для прямого поглощения ДНК. Такие способы известны специалистам из уровня техники (патент США № 5405765, Vasil et al.; Bilang et al. (1991), *Gene*, 100:247-250; Scheid et al. (1991), *Mol. Gen. Genet.*, 228:104-112; Guerche et al. (1987), *Plant Science*, 52:111-116; Neuhauser et al. (1987), *Theor. Appl. Genet.*, 75:30-36; Klein et al. (1987), *Nature*, 327:70-73; Howell et al. (1980), *Science*, 208:1265; Horsch et al. (1985), *Science*, 227:1229-1231; DeBlock et al. (1989), *Plant Physiology*, 91:694-701; *Methods for Plant Molecular Biology* (Weissbach and Weissbach, изд.), Academic Press, Inc. (1988); и *Methods in Plant Molecular Biology* (Schuler and Zielinski, изд.), Academic Press, Inc. (1989).

Прочие пригодные способы введения нуклеотидной последовательности в клетки растения включают микроинъекции в соответствии с описанием, например, в Crossway et al. (1986). *Biotechniques*, 4:320-334, электропорацию, как описано, например, Riggs et al. (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:5602-5606, агробактериальную трансформацию, в соответствии с описанием, например, в Townsend et al., патент США № 5563055, Zhao et al., патент США № 5981840, прямой перенос генов в соответствии с описанием, например, Paszkowski et al. (1984), *EMBO J.*, 3:2717-2722, и баллистическое ускорение частиц в соответствии с описанием, например, в патенты США № 4945050; 5879918; 5886244; и 5932782;

Tomes et al. (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via

Microprojectile Bombardment," в *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental*

Methods, ed. Gamborg and Phillips (Springer-Verlag, Berlin); McCabe et al. (1988)

Biotechnology 6:923-926; и *Led transformation* (WO 00/28058). Также см.

Weissinger et al., (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477; Sanford et al., (1987) *Particulate*

Science and Technology 5:27-37 (лук); Christou et al., (1988) *Plant Physiol.* 87:671-674

(соя); McCabe et al., (1988) *Bio/Technology* 6:923-926 (соя); Finer and McMullen

(1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27P: 175-182 (соя); Singh et al., (1998) *Theor. Appl.*

Genet. 96:319-324 (соя); Datta et al., (1990) Biotechnology 8:736-740 (рис); Klein et al., (1988) PNAS, 85:4305-4309 (маис); Klein et al., (1988) Biotechnology 6:559-563 (маис); патенты США №№ 5,240,855; 5,322,783; и 5,324,646; Tomes et al., (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment," в Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods, ed. Gamborg (Springer-Verlag, Berlin) (маис); Klein et al., (1988) Plant Physiol. 91 :440-444 (маис); Fromm et al., (1990) Biotechnology 8:833-839 (маис); Hooykaas-Van Slogteren et al., (1984) Nature (London) 311 :763-764; Bowen et al, патент США № 5,736,369 (зерновые культуры); Bytebier et al, (1987) PNAS 84:5345- 5349 (Liliaceae); De Wet et al., (1985) в The Experimental Manipulation of Ovule Tissues, ed. Chapman et al, (Longman, New York), стр. 197-209 (пыльца); Каепплер et al., (1990) Plant Cell Reports 9:415-418 и Каепплер et al., (1992) Theor. Apph Genet. 84:560-566 (прокалывание клеток путем встряхивания их в суспензии микроигл); D'Halluin et al., (1992) Plant Cell 4: 1495-1505 (электропорация); Li et al., (1993) Plant Cell Reports 12:250- 255 и Christou and Ford (1995) Annals of Botany 75:407-413 (rice); Osjoda et al, (1996) Nature Biotechnology 14:745-750 (maize via Agrobacterium tumefaciens);

которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

Трансгенные растения, включая трансгенные сельскохозяйственные культуры, предпочтительно производятся с помощью Agrobacterium-зависимой трансформации. Предпочтительный способ трансформации - это трансформация *in planta*. Для этой цели можно позволить агробактериям воздействовать на семена растения или произвести инокуляцию меристемы растения агробактериями. Для целей настоящего изобретения было признано особенно целесообразным, чтобы суспензия трансформированных агробактерий воздействовала на целое растение или на примордий цветка. Затем происходит развитие растения до получения семян обработанного растения (Clough and Bent, Plant J. (1998), 16, 735-743). Способы трансформации риса с помощью Agrobacterium включают известные способы трансформации риса, например, описанные в любом из следующих источников: Европейская патентная заявка EP 1198985 A1, Aldemita and Hodges (Planta, 199:612-617, 1996); Chan et al. (Plant. Mol. Biol., 22(3):491-506, 1993), Hiei et al. (Plant J., 6(2):271-282, 1994), данные документы включены в настоящую заявку в полном объеме посредством ссылки. В случае трансформации кукурузы, предпочтительно используется способ, описанный либо в Ishida et al. (Nat. Biotechnol., 14(6):745-50, 1996) или Frame et al. (Plant Physiol., 129(1):13-22, 2002), данные документы включены в настоящую заявку в полном объеме посредством ссылки. Указанные методы также описаны, например, в B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in Transgenic Plants, том 1, Engineering and Utilization, изд. S.D. Kung and R. Wu, Academic Press (1993), 128-143 и в Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol., 42 (1991), 205-225). Нуклеиновые кислоты или конструктор, подлежащий экспрессии, предпочтительно клонируется в вектор, который подходит для трансформации Agrobacterium tumefaciens, например, pBin19 pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res., 12 (1984), 8711). Агробактерии, трансформированные таким вектором, могут затем использоваться известным способом для трансформации растений, например, растений, используемых в качестве модели, например, Arabidopsis (Arabidopsis thaliana в рамках настоящего изобретения не считается сельскохозяйственной культурой), или сельскохозяйственных культур, таких как, например, табак, путем, например, погружения дробленых или рубленых листьев в агробактериальные растворы и затем культивирования их в подходящей среде. Трансформация растений посредством Agrobacterium tumefaciens описана, например, Höfgen and Willmitzer в Nucl. Acid Res. (1988) 16, 9877 или известна, помимо прочего, из F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; в Transgenic Plants, том 1, Engineering and Utilization, изд. S.D. Kung and R. Wu, Academic Press, 1993, p. 15-38.

Одним из методов трансформации, известных специалистам, является погружение цветущего растения в раствор Agrobacteria, причем Agrobacteria содержат нуклеиновую кислоту TriA, а затем выращивание трансформированных гамет. Трансформацию растения с помощью Agrobacterium можно осуществить, используя, например, GV3101(pMP90) (Koncz and Schell, 1986, Mol. Gen. Genet., 204:383-396) или LBA4404 (Clontech), штаммы Agrobacterium tumefaciens. Трансформацию можно осуществить с помощью стандартных методов трансформации и регенерации (Deblaele et al., 1994, Nucl. Acids. Res., 13:4777-4788; Gelvin, Stanton B. and Schilperoort, Robert A, Plant Molecular Biology Manual, 2-е изд. - Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995. - в Sect., Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P ISBN: 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R. and Thompson, John E., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton: CRC Press, 1993, 360 S., ISBN: 0-8493-5164-2). Например, семена рапса можно трансформировать с помощью трансфор-

мации семядоли или гипокотыля (Moloney et al., 1989, Plant Cell Report, 8:238-242; De Block et al., 1989, Plant Physiol., 91:694-701). Использование антибиотиков для *Agrobacterium* и отбор растений зависит от бинарного вектора и штамма *Agrobacterium*, используемых для трансформации. При отборе семян рапса обычно используют канамицин в качестве селектируемого растительного маркера. Перенос генов с помощью *Agrobacterium* в лен можно осуществить с помощью, например, метода, описанного Mlynarova et al., 1994, Plant Cell Report, 13:282-285. Дополнительно трансформацию сои можно осуществить с помощью, например, метода, описанного в Европейском патенте № 0424047, патенте США № 5322783, Европейском патенте № 0397687, патенте США № 5376543 или патенте США № 5169770. Трансформацию кукурузы можно осуществить с помощью бомбардировки частицами, поглощения ДНК посредством полиэтиленгликоля или метода, использующего карбидно-кремниевое волокно (см., например, Freeling and Walbot "The maize handbook", Springer Verlag: New York (1993), ISBN: 3-540-97826-7). Конкретный пример трансформации кукурузы описан в патенте США № 5990387, а конкретный пример трансформации пшеницы - в заявке РСТ № WO 93/07256.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды по настоящему изобретению могут вводиться в растения путем контакта растений с вирусами или вирусными нуклеиновыми кислотами. Обычно такие способы включают введение конструктора полинуклеотида по изобретению в вирусную молекулу ДНК или РНК. Установлено, что полипептиды по изобретению могут изначально быть синтезированы как часть вирусного полипротеина, который затем может обрабатываться путем протеолиза *in vivo* или *in vitro* для получения целевого рекомбинантного полипептида. Также установлено, что промоторы по изобретению также включают промоторы, используемые для транскрипции вирусными РНК-полимеразами. Способы введения конструктора полинуклеотида в растение и экспрессии кодированного в нем белка с использованием вирусных молекул ДНК и РНК известны специалистам. См., например, патенты США № 5889191, 5889190, 5866785, 5589367 и 5316931; которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Трансформированные клетки могут развиваться в растения в соответствии с обычными способами. См., например, McCormick et al. (1986), Plant Cell Reports, 5:81-84. Затем такие растения могут выращиваться и либо опыляться с использованием такой же трансформированной линии или других линий, после чего может идентифицироваться гибрид с конститутивной экспрессией целевой фенотипической характеристикой. Могут быть выращены два или несколько поколений для того, чтобы обеспечить сохранение и наследование целевой фенотипической характеристики, а затем может производиться сбор семян для того, чтобы обеспечить достижение экспрессии целевой фенотипической характеристики.

Настоящее изобретение может использоваться для трансформации любых видов растений, включая, помимо прочего, однодольные и двудольные растения. Примеры целевых видов растений включают, помимо прочего, кукурузу или маис (*Zea mays*), виды рода *Brassica* (например, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), в частности те виды рода *Brassica*, которые можно использовать при производстве масла из семян, люцерну (*Medicago sativa*), рис (*Oryza sativa*), рожь (*Secale cereale*), сорго (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), просо, например, пеннисетум сизый (*Pennisetum glaucum*), просо обыкновенное (*Panicum miliaceum*), просо итальянское (*Setaria italica*), просо пальчатое (*Eleusine coracana*)), подсолнечник (*Helianthus annuus*), сафлор (*Carthamus tinctorius*), пшеницу (*Triticum aestivum*, *T. Turgidum ssp. durum*), сою (*Glycine max*), табак (*Nicotiana tabacum*), картофель (*Solanum tuberosum*), арахис (*Arachis hypogaea*), хлопок (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), батат (*Ipomoea batatas*), кассаву (*Manihot esculenta*), кофе (виды рода *Coffea*), кокос (*Cocos nucifera*), ананас (*Ananas comosus*), цитрусовые деревья (виды рода *Citrus*), какао (*Theobroma cacao*), чай (*Camellia sinensis*), банан (виды рода *Musa*), авокадо (*Persea americana*), инжир (*Ficus casica*), гуаву (*Psidium guajava*), манго (*Mangifera indica*), оливы (*Olea europaea*), папайю (*Carica papaya*), кешью (*Anacardium occidentale*), макадамию (*Macadamia integrifolia*), миндаль (*Prunus amygdalus*), сахарную свеклу (*Beta vulgaris*), сахарный тростник (виды рода *Saccharum*), овес, ячмень, овощи, декоративные растения и хвойные деревья. Предпочтительно растения по настоящему изобретению являются сельскохозяйственными культурами (например, подсолнечником, видами рода *Brassica*, хлопком, сахарной свеклой, соей, арахисом, люцерной, сафлором, табаком, кукурузой, рисом, пшеницей, рожью, ячменем, тритикале, сорго, просо и т.д.).

В дополнение к трансформации соматических клеток, которые затем регенерируются в целое растение, существует возможность трансформации клеток растительных меристем, в особенности тех клеток, которые становятся гаметами. В данном случае развитие трансформированных гамет происходит естественным путем, образуя трансгенные растения. Так, например, семена *Arabidopsis* обрабатывают агробактериями и из развивающихся растений получают семена, определенное количество которых являются трансформированными, т.е. трансгенными [Feldman, K.A., Marks M.D. (1987), Mol. Gen. Genet., 208:274-289; Feldmann K. (1992), В: С Koncz, N-H Chua and J. Shell, eds, Methods in Arabidopsis Research, World Scientific, Singapore, p. 274-289]. Альтернативные способы основаны на повторяющемся удалении соцветий и выращивании области вырезания в центре розетки с трансформированными агробактериями, таким образом, трансформированные семена могут быть получены на более поздних сроках (Chang (1994), Plant J., 5:551-558; Katavic (1994), Mol. Gen. Genet., 245:363-370). Однако особенно эффективным является способ вакуум-инфильтрации с такими модификациями как способ "цветочного погружения". В случае вакуум-инфильтрации *Arabidopsis*, целые растения обрабатывают под сниженным давлением сус-

пензией агробактерий [Bechthold, N. (1993). *C. R. Acad. Sci. Paris. Life Sci.*, 316:1194-1199], тогда как в случае протокола, называемого "floral-dip" (обмакивание цветков в раствор) развивающаяся цветочная ткань инкубируется с использованием обработанной сурфактантом агробактериальной суспензии [Clough, S.J., Bent, A.F. (1998). *The Plant. J.*, 16, 735-743]. В обоих случаях собирается определенное количество трансгенных семян, данные семена отличаются от нетрансгенных семян, тем, что выращиваются в вышеописанных селекционных условиях. Кроме того, устойчивая трансформация пластидов является предпочтительной, так как пластиды наследуются по материнской линии, следовательно, для большинства культур сокращается или исключается риск трансгенного потока через пыльцу. Трансформация хлоропластного генома обычно достигается благодаря процессу, схематически описанному в Klaus et al., 2004 [Nature Biotechnology, 22 (2), 225-229]. Последовательности, подлежащие трансформации, клонируются вместе с геномом селектируемого маркера между фланкирующими последовательностями, которые являются гомологическими по отношению к геному хлоропласта. Данные гомологические фланкирующие последовательности попадают в пластом путем прямой специфичной интеграции.

Пластидная трансформация описана для многих видов растений, общий обзор которой дан в Bock (2001), *Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology*, J. Mol. Biol., 2001 Sep 21, 312(3):425-38; или Maliga, P. (2003), *Progress towards commercialization of plastid transformation technology*, Trends Biotechnol., 21, 20-28. Результатом дальнейшего биотехнологического развития стали пластидные трансформанты без маркеров, которые могут быть получены переходным коинтегрированным геном-маркером (Klaus et al., 2004, *Nature Biotechnology*, 22(2), 225-229). Генетически модифицированные клетки растений могут быть регенерированы с помощью любых способов, известных специалистам. Подходящие способы можно найти в вышеперечисленных публикациях S.D. Kung, R. Wu, Potrykus или Höfgen and Willmitzer.

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

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

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

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

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

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

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

(a) нуклеотидные последовательности, кодирующие белки, использованные в методах настоящего изобретения; или

(b) генетическая контрольная последовательность(и), которая функционально связана с последовательностью нуклеиновой кислоты по данному изобретению, например промотор; или

(c) a) и b)

не расположены в их естественной генетической среде или были изменены рекомбинантными методами, причем модификация может иметь форму, например, замены, добавления, делеции, инверсии или вставки одного или более нуклеотидных остатков с целью обеспечить возможность экспрессии мутированной TrtA по настоящему изобретению.

Под естественной генетической средой подразумевают естественный геномный или хромосомный локус в исходном растении или нахождение в геномной библиотеке. В случае геномной библиотеки естественная генетическая среда последовательности нуклеиновой кислоты предпочтительно сохраняется, по меньшей мере, частично. Среда примыкает к последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере с одной стороны и имеет последовательность длиной по меньшей мере 50 п. о., предпочтительно по меньшей мере 500 п. о., особенно предпочтительно по меньшей мере 1000 п. о. и наиболее предпочтительно по меньшей мере 5000 п. о. Природная кассета экспрессии, например природная комбинация природного промотора нуклеотидных последовательностей с соответствующей нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид, подходящий для способов настоящего изобретения, как определено выше, становится трансгенной кассетой экспрессии, когда кассета экспрессии изменяется с помощью не природных, синтетических ("искусственных") методов, таких как, например, мутагенная обработка. Подходящие методы описаны, например, в US 5565350 или WO 00/15815.

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

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

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

Растения настоящего изобретения, стойкие к гербицидам, содержащие полинуклеотиды, кодирую-

щие полипептиды с мутированной TrtA, также используются в способах повышения стойкости растений к гербицидам путем стандартного разведения растений, включая половое размножение. Эти способы включают скрещивание первого растения, которое является стойким к гербицидам растением изобретения, со вторым растением, которое может быть или может не быть стойким, как и первое растение, к тому же гербициду или гербицидам или может быть стойким к другому гербициду или гербицидам в отличие от первого растения. Вторым растением может быть любое растение, способное производить жизнеспособное потомство (т.е. семена) после скрещивания с первым растением. Чаще всего, но не обязательно первое и второе растения являются растениями одного вида. Эти способы при необходимости могут включать отбор растений-потомков, содержащих полипептиды с мутированной TrtA первого растения и характеристики стойкости к гербицидам второго растения. Потомство растений, полученное данным способом настоящего изобретения, обладает повышенной стойкостью к гербицидам по сравнению с первым или вторым растением или обоими растениями. Если первое и второе растения являются стойкими к разным гербицидам, потомство растений будет иметь комбинированные характеристики устойчивости к гербицидам, свойственные первому и второму растениям. Методы изобретения могут включать одно или несколько поколений обратного скрещивания потомства растений первого скрещивания с растением той же линии или генотипа, как у первого или второго растения. В качестве альтернативы потомство первого скрещивания или любого последующего скрещивания может быть скрещено с третьим растением, которое имеет другую линию или генотип по сравнению с первым или вторым растением.

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

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

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

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

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

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

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

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

Подобные характеристики устойчивости могут выражаться, например, в качестве мутантных белков или белков с ГФПД дикого типа, в качестве мутантных белков или белков с PPO дикого типа, мутантных белков AHASL, мутантных белков ACCase, мутантных белков EPSPS или белков мутантной глутаминсинтетазы; либо в качестве родной, выведенной путем родственного скрещивания или трансгенной арилоксиалканоксидогидрогеназы (AAD или DHT), галоарилнитрилов (BXN), 2,2-дихлорпропионовой кислоты дегалогеназы (DEH), глифосат-N-ацетилтрансферазы (GAT), глифосат декарбоксилазы (GDC), глифосатоксидоредуктазы (GOX), глутатион-S-трансферазы (GST), фосфинотрицин ацетилтрансферазы (PAT или бар) или белки CYP450, имеющие гербицидопонижающую активность. Растения по настоящему изобретению, устойчивые к гербицидам, можно также сочетать с другими характеристиками, включая, в том числе, пестицидные черты, такие как Bt Cry и другие белки с пестицидной активностью к жесткокрылым насекомым, чешуйчатокрылым, нематодам и другим вредителям; питательные илинутрицевитические характеристики, такие как измененное содержание масла и другие известные в данной области знаний.

Более того, в других вариантах осуществления изобретения устойчивые к гербицидам растения также включены в область изобретения посредством использования технологий рекомбинантных ДНК и/или селекции и/или отбираются иным образом по данным характеристикам, которые способны синтезировать один или более инсектицидных белков, особенно белки из бактериального вида *Bacillus*, в частности, *Bacillus thuringiensis*, такие как [дельта]-эндотоксины, например CryIA(b), CryIA(c), CryIF, CryIF(a2), CryIIA(b), CryIIIA, CryIIIB(b1) или Cry9c; растительные инсектицидные белки (VIP), например VIP1, VIP2, VIP3 или VIP3A; инсектицидные белки колонизирующих бактерии нематодов, например, *Photorhabdus* spp. или *Xenorhabdus* spp.; токсины, вырабатываемые животными, такие как токсины скорпиона, токсины паукообразных, токсины ос, либо другие специфичные нейротоксины насекомых; токсины, вырабатываемые грибами, такие как токсины стрептомицетов; растительные лектины, такие как лектины гороха или ячменя; агглютинин; ингибиторы протеиназы, такие как трипсин ингибиторы, серин-протеаза ингибиторы, пататин, цистатин или папаин ингибиторы; белки, инактивирующие рибосому (RIP), такие как рицин, кукуруза-RIP, абрин, луффин, сапорин или бриодин; энзимы метаболизма стероидов, такие как 3-гедрокси-стероид оксидаза, экдистероиды-IDP-гликозил-трансфераза, холестеролоксидаза, ингибиторы экдиозоны или HMG-CoA-редуктаза; ингибиторы ионных каналов, такие как ингибиторы каналов натрия или кальция; ювенильный гормон эстераза; диуретические рецепторы гормона (спирально кининовой рецепторы); стильбена синтазы, бибензил синтазы, хитиназа или гликаназы. В контексте настоящего изобретения, под данными инсектицидными белками или токсинами должны пониматься также претоксины, гибридные белки, укороченные или модифицированные другим способом белки. Гибридные белки характеризуются новыми комбинациями белковых доменов (см., например, WO 02/015701). Примеры подобных токсинов или генетически модифицированных растений, способных синтезировать такие токсины, описаны, например, в EP-A 374753, WO 93/007278, WO 95/34656, EP-A 427529, EP-A 451878, WO 03/18810 и WO 03/52073. Способы производства подобных генетически модифицированных растений известны специалистам данной области и описаны, например, в вышеуказанных публикациях. Данные инсектицидные белки, которые содержатся в генетически модифицированных растениях, придают растениям, производящим данные белки, устойчивость к вредителям всех таксономических групп членистоногих, в особенности жукам (Coeloptera), двукрылым насекомым (Diptera), мотылькам (Lepidoptera) и круглым червям (Nematoda).

В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессия одного или более белковых токсинов (например, инсектицидных белков) в растения, устойчивые к гербицидам, является эффективным средством контроля организмов, включающих, например, представителей классов и порядков: жесткокрылые, такие как американская фасоловая зерновка *Acanthoscelides obtectus*; листоед *Agelastica alni*; жуки-щелкуны (*Agriotes lineatus*, *Agriotes obscurus*, *Agriotes bicolor*); масличная плоскотелка *Ahasverus advena*; хрущ июньский *Amphimallon solstitialis*; мебельный точильщик *Anobium punctatum*; *Anthonomus* spp. (долгоносики); крошка свекловичная *Atomaria linearis*; кожееды (*Anthrenus* spp., *Attagenus* spp.); зерновка четырехпятнистая *Callosobruchus maculatus*; блестянка полужесткокрылая *Carpophilus hemipterus*; рапсовый семенной скрытохоботник *Ceutorhynchus assimilis*; скрытохоботник рапсовый стеблевой зимний *Ceutorhynchus picipitarsis*; проволочники *Conoderus vespertinus* и *Conoderus falli*; слоник банановый *Cosmopolites sordidus*; новозеландский травяной жук *Costelytra zealandica*; хрущ блестящий зеленый *Cotinis nitida*; скрытохоботник стеблевой подсолнечниковый *Cylindrocaptus adspersus*; ветчинный кожеед *Dermestes lardarius*; злаковые корневые черви *Diabrotica virgifera*, *Diabrotica virgifera virgifera* и *Diabrotica barberi*; мексиканская зерновка бобовая *Epilachna varivestis*; дровосек домовый *Hylotrupes bajulus*; долгоносик листовой люцерновый *Hypura postica*; притворяшка блестящая *Gibbium psyllodes*; табачный жук *Lasioderma serricorne*; колорадский жук *Leptinotarsa decemlineata*; древогрызы *Lyctus* spp., рапсовый цветоед *Meligethes aeneus*; майский хрущ западный *Melolontha melolontha*; противорашка американский *Mezium americanum*; притворяшка шелковистый *Niptus hololeucus*; точильщики хлебные *Oryzaephilus surinamensis* и *Oryzaephilus Mercator*; скосарь бороздчатый *Otiorynchus sulcatus*; листоед хреновый *Phaedon cochleariae*; блошка крестоцветная *Phyllotreta cruciferae*; блошка полосатая *Phyllotreta striolata*; блошка рапсовая *Psylliodes chrysocephala*; *Ptinus* spp. (противорашки); точильщик зерновой *Rhizopertha dominica*; долгоносик полосатый *Sitona lineatus*; долгоносики рисовые и амбарные *Sitophilus oryzae* и *Sitophilus*; красный долгоносик подсолнечника *Smicronyx fulvus*; точильщик хлебный *Stegobium paniceum*; хрущак мучной большой *Tenebrio molitor*, хрущаки малые мучные (*Tribolium confusum*) *Tribolium castaneum* и *Tribolium confusum*; трогодермы (*Trogoderma* spp.); совка подсолнечниковая восклицательная *Zygotogramma exclamationis*; кожистокрылые (уховертки), такие как уховертка обыкновенная *Forficula auricularia* и уховертка прибрежная *Labidura riparia*; тараканообразные, такие как таракан черный *Blatta orientalis*; многоножка тепличная *Oxidus gracilis*; муха свекловичная *Pegomyia betae*; мушка шведская *Oscinella frit*; плодовые мушки (*Dacus* spp., *Drosophila* spp.); белые муравьи (термиты), включая виды, представляющие семейства термитов-жнецов, древоядных термитов, Дарвиновы термиты, носатые термиты, крылатые термиты, *Termitidae*, *Termopsidae*; клоп травяной *Lygus lineolaris*; тля свекловичная *Aphis fabae*; тля бахчевая и хлопковая *Aphis gossypii*; тля яблоневая зеленая *Aphis pomi*; белокрылка цитрусовая (*Dialeurodes citri*) *Aleurocanthus spiniferus*; табачная белокрылка *Bemisia tabaci*; капустная тля *Brevicoryne brassicae*; медяница грушевая *Sacopsylla pyricola*; тля смородинная *Cryptomyzus ribis*; филлоксеры виноградно-листовая *Daktulosphaira vitifoliae*; листоблошка цитрусовая *Diaphorina citri*; цикадка картофельная *Empoasca fabae*; цикадка бобовая *Empoasca Solana*; цикадка виноградно-листовая *Empoasca vitis*; пушистая тля *Eriosoma lanigerum*; щитовка устрицевидная *Eulecanium corni*; тля сливовая опыленная *Hyalopterus arundinis*; темная цикадка *Laodelphax striatellus*; тля картофельная листовая *Macrosiphum euphorbiae*; тля персиковая зеленая *Myzus persicae*; цикадка рисовая зеленая *Nephotettix cincticeps*; цикадка коричневая *Nilaparvata lugens*; тля хмелевая *Phorodon humuli*; тля черемуховая обыкновенная *Rhopalosiphum padi*; тля большая злаковая *Sitobion avenae*; чешуекрылые, такие как *Adoxophyes orana* (листовертка сетчатая); *Archips podana* (листовертка всеядная); *Bucculatrix pygmaea* (минер грушевый); *Bucculatrix thurberiella* (моль кривоусая хлопковая); *Bupalus piniarius* (пяденица сосновая); *Carpocapsa pomonella* (яблонная плодоярка); *Chilo suppressalis* (огневка азиатская стеблевая); *Choristoneura fumiferana* (еловая листовертка-почкоед); *Cochylis hospes* (шерстолапка подсолнечниковая); *Diatraea grandiosella* (огневка кукурузная юго-западная); *Eupoecilia ambiguella* (гроздевая листовертка); *Helicoverpa armigera* (коробочный червь); *Helicoverpa zea* (коробочный червь); *Heliothis vires cens* (листовертка-почкоед табачная); *Homoeosoma electellum* (огневка подсолнечниковая); *Homona magnanima* (листовертка чайная западная); *Lithocolletis blancardella* (плодовая нижнеминирующая моль-пестрянка); *Lymantria dispar* (шелкопряд непарный); *Malacosoma neustria* (коконопряд); *Mamestra brassicae* (совка капустная); *Mamestra configurata* (совка латуковая); *Operophtera brumata* (пяденица зимняя); *Ostrinia nubilalis* (мотылек кукурузный), *Panolis flammea* (совка сосновая), *Phyllocnistis citrella* (минер листовой цитрусовый); *Pieris brassicae* (белянка капустная); *Rachiplusia ni* (совка соевая); *Spodoptera exigua* (совка малая); *Spodoptera littoralis* (гусеница хлопковая); *Sylepta derogata* (листовертка хлопковая); *Trichoplusia ni* (совка капустная); прямокрылые, такие как сверчок обыкновенный *Acheta domesticus*, саранча египетская (*Anacridium* spp.), саранча перелетная *Locusta migratoria*, кобылка двухполосая *Melanoplus bivittatus*, кобылка отличительная *Melanoplus differentialis*, кобылка краснобедрая *Melanoplus femurrubrum*, кобылка перелетная *Melanoplus sanguinipes*, медведка десятипалая *Neocurtilla hexadactyla*, саранча *Nomadacris septemfasciata*, медведка короткокрылая *Scapteriscus abbreviatus*, медведка южная *Scapteriscus borellii*, медведка рыжевато-бурая *Scapteriscus vicinipennis*, и саранча пустынная *Schistocerca gregaria*; симфилы, такие как многоножка садовая *Scutigerella immaculata*; бахромчатокрылые, такие как трипс табачный *Frankliniella fusca*, трипс обыкновенный *Frankliniella intonsa*, трипс западный цветочный *Frankliniella occidentalis*, трипс хлопковый *Frankliniella*

schultzei, трипс декоративный *Hercinothrips femoralis*, трипс соевый *Neohydatothrips variabilis*, трипс цитрусовый *Pezothrips kellyanus*, трипс авокадо *Scirtothrips perseae*, трипс дыневый *Thrips palmi*, и трипс луковый *Thrips tabaci*; и аналогичные организмы, а также их комбинации, включающие один или несколько указанных организмов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессия одного или более белковых токсинов (например, инсектицидных белков) в растения, устойчивые к гербицидам, является эффективным средством контроля листогрызов, т.е. представителей подсемейства листогрызов семейства листоедов, предпочтительно *Phyllotreta* spp., таких как *Phyllotreta cruciferae* и/или *Phyllotreta triolata*. В других вариантах осуществления изобретения экспрессия одного или более белковых токсинов (например, инсектицидных белков) в растения, устойчивые к гербицидам, является эффективным средством контроля рапсового семенного скрытохотника, совки латуковой, слепняков или моли капустной.

Более того, в одном варианте осуществления изобретения растения, устойчивые к гербицидам, также входят в область изобретения, например, с помощью технологий рекомбинантных ДНК и/или селекции и/или отбираются иным образом по данным характеристикам, которые способны синтезировать один или более белок для повышения устойчивости или стойкости данных растений к бактериальным, вирусным или грибковым патогенам. Способы получения подобных генетически модифицированных растений известны специалистам.

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

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

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

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

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

Другие варианты осуществления изобретения растения, демонстрирующие устойчивость к гербицидам, по сравнению с растениями дикого вида, предусматривают большее количество или улучшенный профиль соединения, выбранного из группы, в состав которой входят винкристины, винбластин, таксаны (например, таксол (паклитаксел), баккатин III, 10-деацетил баккатин III, 10-деацетил таксол, ксилосил таксол, 7-эпитаксол, 7-эпибаккатин III, 10-деацетил цефаломанин, 7-эпицефаломанин, таксотер, цефаломанин, ксилосил цефаломанин, таксагифин, 8-бензилокси таксагифин, 9-ацетилокси таксусин, 9-гидрокси таксусин, тайванксам, таксан Ia, таксан Ib, таксан Ic, таксан Id, GMP паклитаксел, 9-дигидро 13-ацетилбаккатин III, 10-деацетил-7-эпитаксол, тетрагидроканнабинол (ТГК), каннабидиол (КБД), гени-

стеин, диадзеин, кодеин, морфин, хинин, шиконин, аймалазин, серпентин и тому подобные.

В других аспектах предусмотрен способ обработки растения по настоящему изобретению.

При некоторых вариантах осуществления изобретения данный способ предусматривает нанесение на растения композиции, которая является приемлемой с сельскохозяйственной точки зрения. В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения, приемлемая с сельскохозяйственной точки зрения композиция содержит ауксиновый гербицид А. I.

Согласно еще одному аспекту изобретения, изобретение предоставляет способ получения семян-потомков. Способ предусматривает посадку семян растения по настоящему изобретению или семян, из которых можно получить растение по настоящему изобретению. В одном из вариантов осуществления способ также предусматривает выращивание растения-потомка из семени, а также сбор семян-потомков растения-потомка. При других вариантах осуществления изобретения способ также предусматривает применение гербицидной композиции гербицидов в отношении растения.

В еще одном варианте осуществления данное изобретение относится к пожинаемым частям трансгенного растения по настоящему изобретению. Пригодные для заготовки части предпочтительно содержат нуклеиновую кислоту TriA или белок TriA по настоящему изобретению. Пожинаемыми частями могут являться семена, корни, листья и/или цветки, содержащие нуклеиновую кислоту TriA или протеин TriA, или их части. Предпочтительными частями сои являются соевые бобы, содержащие нуклеиновую кислоту TriA или белок TriA.

В еще одном варианте осуществления данное изобретение относится к продукции, получаемой из трансгенного растения по настоящему изобретению, его частей или пожинаемых частей такого растения. Предпочтительным растительным продуктом является фураж, жмыховая мука, масло и обработанные или дражированные семена. Предпочтительно мука и/или масло содержат нуклеиновые кислоты TriA или белки TriA.

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

а) выращивание растений по изобретению или растений, которые могут быть получены способами по изобретению; и

б) производство указанного продукта из или с использованием растений по изобретению и/или частей указанных растений, например их семян.

Еще в одном варианте осуществления изобретения способ предусматривает следующие этапы:

а) выращивание растений по изобретению;

б) удаление пригодных для заготовки частей растений, описание которых приведено выше; а также

с) производство указанного продукта из или с использованием частей растений, пригодных для заготовки, по изобретению.

Данные продукты могут производиться в месте выращивания растений, либо для производства данных продуктов указанные растения и/или их части могут быть перенесены с места выращивания. Обычно, растение выращивается, и требующиеся части, пригодные для заготовки, извлекаются из растения (если это целесообразно в ходе повторяющихся технологических циклов), после чего продукт производится из частей растения, пригодных для заготовки. При применении способов по изобретению этап выращивания растения может производиться только один раз, а этап производства продукта может происходить в ходе повторяющихся технологических циклов, например, может циклически повторяться этап удаления частей растения, пригодных для заготовки, по изобретению и, при необходимости, этап дальнейшей обработки этих частей растений для получения продукта. Также возможно, что этап выращивания растений по изобретению повторяется, и растения или части растений, пригодные для заготовки, хранятся до этапа производства продукта из накопленного запаса растений или частей растений. Также этапы выращивания растений и производства продукта могут происходить одновременно, частично или полностью. Обычно растения выращиваются в течение определенного времени до этапа производства продукта.

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

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

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

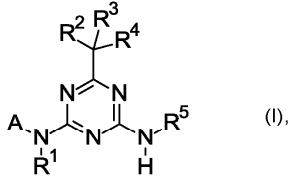
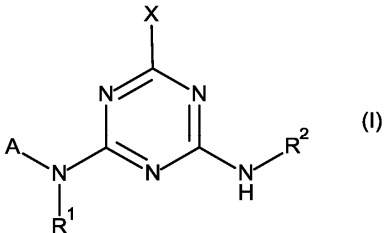
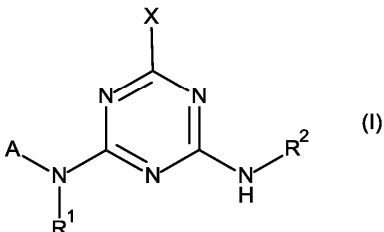
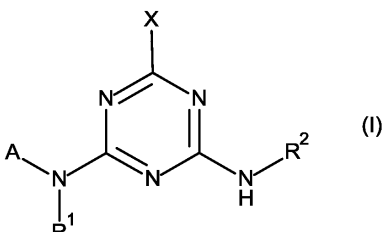
Гербициды.

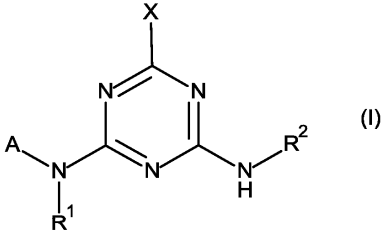
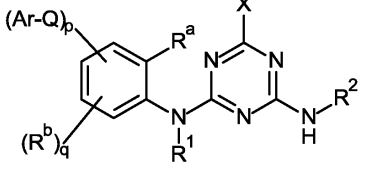
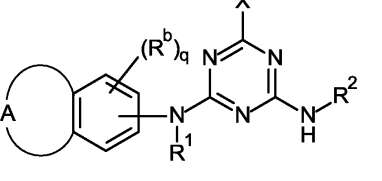
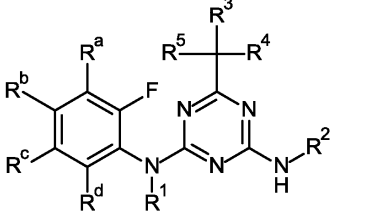
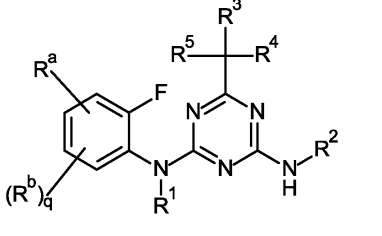
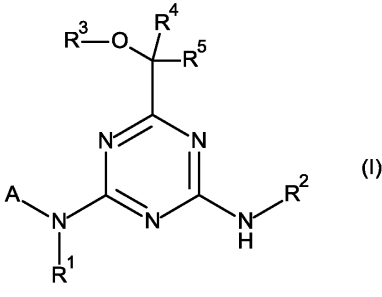
Как описано выше, настоящим изобретением предоставляются нуклеиновые кислоты, полипептиды, придающие растениям устойчивость к соединениям/гербицидам, подавляющим или препятствующим

щим биосинтезу клеточной стенки (целлюлозы).

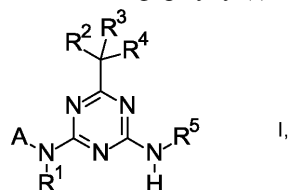
Примерами гербицидов, которые могут использоваться в соответствии с настоящим изобретением, т.е. гербицидов, устойчивостью/стойкостью к которым обладают растения по настоящему изобретению, являются соединения известные специалистам, такие как азины. Примеры азинов подробно описаны в следующих патентных заявках, указанных в приведенной ниже табл. 1, которые включены в настоящую заявку посредством ссылки в полном объеме.

Таблица 1

Структурная Формула	Номер заявки/Внутренняя ссылка; номер публикации
 (I),	PCT/EP2014/065092 PF75365; WO2015/007711
 (II)	EP 14 162 309.0 PF76068; WO2015/144881
 (III)	EP 14163356.0 PF76069; WO2015/150541
 (IV)	EP 14163742.1 PF76635; WO2015/155129

 (I)	EP 14163743.9 PF76636, EP2930174
	EP 14165565.4 PF76857; WO2015/162166
	EP 14165624.9 PF76888; WO2015/162169
	EP 14164431.0 PF76890; WO2015/155271
	EP 14164434.4 PF76930; WO2015/155272
 (I)	EP 14164433.6 PF77027; WO2015/155273

Примерами предпочтительных гербицидов, которые могут использоваться в соответствии с настоящим изобретением, являются азины, имеющие формулу (I)



где А означает фенил, замещенный двумя - пятью заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-галоалкила, C₂-C₆-алкенила, C₂-C₆-галоалкила, C₂-C₆-алкинила,

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

R¹ означает H, CN, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галоалкил, C₁-C₆-алкокси-C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-алкокси, (C₁-C₆-алкил)карбонил, (C₁-C₆-алкокси)карбонил, (C₁-C₆-алкил)сульфонил или фенилсульфонил, где фенил не замещен или замещен одним - пятью заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-галоалкила и C₁-C₆-алкокси;

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

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

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

R³ и R⁴ вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют фрагмент, выбранный из группы, состоящей из карбонила, C₂-C₆-алкенила, C₃-C₆-циклоалкила, C₃-C₆-циклоалкенила и трех-шести-членного гетероциклила, где C₃-C₆-циклоалкил, C₃-C₆-циклоалкенил или трех-шести-членный гетероциклил не замещены или замещены одним - тремя заместителями, выбранными из галогена, CN, C₁-C₆-алкила и C₁-C₆-алкокси;

R⁵ означает H, CN, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галоалкил, C₁-C₆-алкокси-C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-алкокси, (C₁-C₆-алкил)карбонил, (C₁-C₆-алкокси)карбонил, (C₁-C₆-алкил)сульфонил или фенилсульфонил, где фенил не замещен или замещен одним - пятью заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-галоалкила и C₁-C₆-алкокси; включая их приемлемые с точки зрения сельского хозяйства соли или оксиды азота.

Предпочтительно настоящим изобретением предоставляются азины формулы (I), причем

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

R¹ означает H, CN, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галоалкил, C₁-C₆-алкокси-C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-алкокси, (C₁-C₆-алкил)карбонил, (C₁-C₆-алкокси)карбонил, (C₁-C₆-алкил)сульфонил или фенилсульфонил, где фенил не замещен или замещен одним - пятью заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-галоалкила и C₁-C₆-алкокси;

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

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

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

R³ и R⁴ вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют фрагмент, выбранный из группы, состоящей из карбонила, C₂-C₆-алкенила, C₃-C₆-циклоалкила, C₃-C₆-циклоалкенила и трех-шести-членного гетероциклила, где C₃-C₆-циклоалкил, C₃-C₆-циклоалкенил и/или трех-шести-членный гетероциклил не замещены или замещены одним - тремя заместителями, выбранными из галогена, CN, C₁-C₆-алкила и C₁-C₆-алкокси;

R⁵ означает H, CN, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галоалкил, C₁-C₆-алкокси-C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-алкокси, (C₁-C₆-алкил)карбонил, (C₁-C₆-алкокси)карбонил, (C₁-C₆-алкил)сульфонил или фенилсульфонил, где фенил не замещен или замещен одним - пятью заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-галоалкила и C₁-C₆-алкокси; включая их приемлемые с точки зрения сельского хозяйства соли или оксиды азота.

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

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

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

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

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

Предпочтительными катионами являются ионы щелочных металлов, предпочтительно лития, натрия и калия, щелочноземельных металлов, предпочтительно кальция и магния, а также переходных ме-

таллов, предпочтительно марганца, меди, цинка и железа, более предпочтительно аммоний и замещенный аммоний, в которых от одного до четырех атомов водорода замещены на C_1 - C_4 -алкил, гидроксид- C_1 - C_4 -алкил, C_1 - C_4 -алкокси- C_1 - C_4 -алкил, гидроксид- C_1 - C_4 -алкокси- C_1 - C_4 -алкил, фенил или бензил, предпочтительно аммоний, метиламмоний, изопропиламмоний, диметиламмоний, диизопропиламмоний, триметиламмоний, гептиламмоний, додециламмоний, тетрадециламмоний, тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, тетрабутиламмоний, 2-гидроксиламмоний (оламинавая соль), 2-(2-гидроксиэтил-1-окси)этил-1-иламмоний(дигликоламинавая соль), ди(2-гидроксиэтил-1-ил)аммоний (диоламинавая соль), трис(2-гидроксиэтил)аммоний (троламинавая соль), трис(2-гидроксипропил)аммоний, бензилтриметиламмоний, етилтриэтиламмоний, N,N,N-триметилонаммоний (холиновая соль), более предпочтительно ионы фосфония, ионы сульфония, предпочтительно три(C_1 - C_4 -алкил)сульфониум, такой как три(C_1 - C_4 -алкил)сульфоксоний, и наконец соли многоосновных аминов, таких как N,N-бис-(3-аминопропил)метиламин и диэтилентриамин.

Анионы пригодных солей присоединения кислоты включают в основном хлорид, бромид, фторид, йодид, гидрогенсульфат, метилсульфат, сульфат, дигидрогенфосфат, гидрогенфосфат, нитрат, бикарбонат, карбонат, гексафторсиликат, гексафторфосфат, бензоат, а также анионы C_1 - C_4 -алкановых кислот, предпочтительно формат, ацетат, пропионат и бутират.

Органические группы, указанные в определении переменных R^1 - R^5 , являются (как, например, термин "галоген") собирательными терминами для перечисления отдельных членов группы. Термин "галоген" означает в каждом случае фтор, хлор, бром или йод. Все углеводородные цепочки, т.е. алкил, галоалкил, алкенил, алкинил, алкокси, алкилтио, алкилсульфинил, алкилсульфонил, (алкил)амино, ди(алкил)амино цепочки могут быть неразветвленными, либо разветвленными, причем приставка C_n - C_m в каждом случае означает возможное число атомов углерода в группе.

Примерами таких значений являются

C_1 - C_4 -алкил: например CH_3 , C_2H_5 , н-пропил, $CH(CH_3)_2$, н-бутил, $CH(CH_3)-C_2H_5$, $CH_2-CH(CH_3)_2$ и $C(CH_3)_3$;

C_1 - C_6 -алкил а также C_1 - C_6 -алкильные фрагменты (C_1 - C_6 -алкил)карбонила, C_1 - C_6 -алкокси- C_1 - C_6 -алкила: C_1 - C_4 -алкил, как указано выше, а также, например, н-пентил, 1-метилбутил, 2-метилбутил, 3-метилбутил, 2,2-диметилпропил, 1-этилпропил, н-гексил, 1,1-диметилпропил, 1,2-диметилпропил, 1-метилпентил, 2-метилпентил, 3-метилпентил, 4-метилпентил, 1,1-диметилбутил, 1,2-диметилбутил, 1,3-диметилбутил, 2,2-диметилбутил, 2,3-диметилбутил, 3,3-диметилбутил, 1-этилбутил, 2-этилбутил, 1,1,2-триметилпропил, 1,2,2-триметилпропил, 1-этил-1-метилпропил или 1-этил-2-метилпропил, предпочтительно метил, этил, н-пропил, 1-метилэтил, н-бутил, 1,1-диметилэтил, н-пентил или н-гексил;

C_1 - C_4 -галогеналкил: C_1 - C_4 -алкильные радикалы, как указано выше, которые могут быть полностью или частично замещены фтором, хлором, бромом и/или йодом, например, хлорметил, дихлорметил, трихлорметил, фторметил, дифторметил, трифторметил, хлорфторметил, дихлорфторметил, хлордифторметил, бромметил, йодметил, 2-фторэтил, 2-хлорэтил, 2-бромэтил, 2-йодэтил, 2,2-дифторэтил, 2,2,2-трифторэтил, 2-хлор-2-фторэтил, 2-хлор-2,2-дифторэтил, 2,2-дихлор-2-фторэтил, 2,2,2-трихлорэтил, пентафторэтил, 2-фторпропил, 3-фторпропил, 2,2-дифторпропил, 2,3-дифторпропил, 2-хлорпропил, 3-хлорпропил, 2,3-дихлорпропил, 2-бромпропил, 3-бромпропил, 3,3,3-трифторпропил, 3,3,3-трихлорпропил, 2,2,3,3,3-пентафторпропил, гептафторпропил, C_1 - C_3 -галогеналкильные радикалы, как указано выше, а также, например, 1-(фторметил)-2-фторэтил, 1-(хлорметил)-2-хлорэтил, 1-(бромметил)-2-бромэтил, 4-фторбутил, 4-хлорбутил, 4-бромбутил, нафтафторбутил, 1,1,2,2-тетрафторэтил и 1-трифторметил-1,2,2,2-тетрафторэтил;

C_1 - C_6 -галоалкил: C_1 - C_4 -галогеналкил, как указано выше, а также, например, 5-фторпентил, 5-хлорпентил, 5-бромпентил, 5-йодпентил, ундекафторпентил, 6-фторгексил, 6-хлоргексил, 6-бромгексил, 6-йодгексил и додекафторгексил;

C_3 - C_6 -циклоалкил: моноциклические насыщенные алкильные группы с 3 - 6 членами углеродного кольца, такие как циклопропил, циклобутил, циклопентил и циклогексил;

C_2 - C_6 -алкенил: например 1-пропенил, 2-пропенил, 1-метилэпенил, 1-бутенил, 2-бутенил, 3-бутенил, 1-метил-1-пропенил, 2-метил-1-пропенил, 1-метил-2-пропенил, 2-метил-2-пропенил, 1-пентенил, 2-пентенил, 3-пентенил, 4-пентенил, 1-метил-1-бутенил, 2-метил-1-бутенил, 3-метил-1-бутенил, 1-метил-бутенил, 2-метил-2-бутенил, 3-метил-2-бутенил, 1-метил-3-бутенил, 2-метил-3-бутенил, 3-метил-3-бутенил, 1,1-диметил-2-пропенил, 1,2-диметил-1-пропенил, 1,2-диметил-2-пропенил, 1-этил-1-пропенил, 1-этил-2-пропенил, 1-гексенил, 2-гексенил, 3-гексенил, 4-гексенил, 5-гексенил, 1-метил-1-пентенил, 2-метил-1-пентенил, 3-метил-1-пентенил, 4-метил-1-пентенил, 1-метил-2-пентенил, 2-метил-2-пентенил, 3-метил-2-пентенил, 4-метил-2-пентенил, 1-метил-3-пентенил, 2-метил-3-пентенил, 3-метил-3-пентенил, 4-метил-3-пентенил, 1-метил-4-пентенил, 2-метил-4-пентенил, 3-метил-4-пентенил, 4-метил-4-пентенил, 1,1-диметил-2-бутенил, 1,1-диметил-3-бутенил, 1,2-диметил-1-бутенил, 1,2-диметил-2-бутенил, 1,2-диметил-3-бутенил, 1,3-диметил-1-бутенил, 1,3-диметил-2-бутенил, 1,3-диметил-3-бутенил, 2,2-диметил-3-бутенил, 2,3-диметил-1-бутенил, 2,3-диметил-2-бутенил, 2,3-диметил-3-бутенил, 3,3-диметил-1-бутенил, 3,3-диметил-2-бутенил, 1-этил-1-бутенил, 1-этил-2-бутенил, 1-этил-3-бутенил, 2-этил-1-бутенил, 2-этил-2-бутенил, 2-этил-3-бутенил, 1,1,2-триметил-2-пропенил, 1-этил-1-метил-2-пропенил, 1-этил-2-метил-1-

пропенил и 1-этил-2-метил-2-пропенил;

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

C₃-C₆-алкинил: например 1-пропилил, 2-пропилил, 1-бутилил, 2-бутилил, 3-бутилил, 1-метил-2-пропилил, 1-пентил, 2-пентил, 3-пентил, 4-пентил, 1-метил-2-бутилил, 1-метил-3-бутилил, 2-метил-3-бутилил, 3-метил-1-бутилил, 1,1-диметил-2-пропилил, 1-этил-2-пропилил, 1-гексил, 2-гексил, 3-гексил, 4-гексил, 5-гексил, 1-метил-2-пентил, 1-метил-3-пентил, 1-метил-4-пентил, 2-метил-3-пентил, 2-метил-4-пентил, 3-метил-1-пентил, 3-метил-4-пентил, 4-метил-1-пентил, 4-метил-2-пентил, 1,1-диметил-2-бутилил, 1,1-диметил-3-бутилил, 1,2-диметил-3-бутилил, 2,2-диметил-3-бутилил, 3,3-диметил-1-бутилил, 1-этил-2-бутилил, 1-этил-3-бутилил, 2-этил-3-бутилил и 1-этил-1-метил-2-пропилил;

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

C₁-C₆-алкокси и также C₁-C₆-алкокси фрагменты (C₁-C₆-алкокси)карбонила, C₁-C₆-алкокси-C₁-C₆-алкила: C₁-C₄-алкокси, как указано выше, а также, например, пентокси, 1-метилбутокси, 2-метилбутокси, 3-метоксибутокси, 1,1-диметилпропокси, 1,2-диметилпропокси, 2,2-диметилпропокси, 1-этилпропокси, гексокси, 1-метилпентокси, 2-метилпентокси, 3-метилпентокси, 4-метилпентокси, 1,1-диметилбутокси, 1,2-диметилбутокси, 1,3-диметилбутокси, 2,2-диметилбутокси, 2,3-диметилбутокси, 3,3-диметилбутокси, 1-этилбутокси, 2-этилбутокси, 1,1,2-триметилпропокси, 1,2,2-триметилпропокси, 1-этил-1-метилпропокси и 1-этил-2-метилпропокси.

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

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

C₁-C₆-алкилсульфинил (C₁-C₆-алкил-S(=O)-): метилсульфинил, этилсульфинил, пропилсульфинил, 1-метилэтилсульфинил, бутилсульфинил, 1-метилпропилсульфинил, 2-метилпропилсульфинил, 1,1-диметилэтилсульфинил, пентилсульфинил, 1-метилбутилсульфинил, 2-метилбутилсульфинил, 3-метилбутилсульфинил, 2,2-диметилпропилсульфинил, 1-этилпропилсульфинил, 1,1-диметилпропилсульфинил, 1,2-диметилпропилсульфинил, гексилсульфинил, 1-метилпентилсульфинил, 2-метилпентилсульфинил, 3-метилпентилсульфинил, 4-метилпентилсульфинил, 1,1-диметилбутилсульфинил, 1,2-диметилбутилсульфинил, 1,3-диметилбутилсульфинил, 2,2-диметилбутилсульфинил, 2,3-диметилбутилсульфинил, 3,3-диметилбутилсульфинил, 1-этилбутилсульфинил, 2-этилбутилсульфинил, 1,1,2-триметилпропилсульфинил, 1,2,2-триметилпропилсульфинил, 1-этил-1-метилпропилсульфинил и 1-этил-2-метилпропилсульфинил;

C₁-C₆-алкилсульфонил (C₁-C₆-алкил-S(O)₂-): метилсульфонил, этилсульфонил, пропилсульфонил, 1-метилэтилсульфонил, бутилсульфонил, 1-метилпропилсульфонил, 2-метилпропилсульфонил, 1,1-диметилэтилсульфонил, пентилсульфонил, 1-метилбутилсульфонил, 2-метилбутилсульфонил, 3-метилбутилсульфонил, 1,1-диметилпропилсульфонил, 1,2-этилпропилсульфонил, 2,2-диметилпропилсульфонил, 1-диметилпропилсульфонил, гексилсульфонил, 1-метилпентилсульфонил, 2-метилпентилсульфонил, 3-метилпентилсульфонил, 4-метилпентилсульфонил, 1,1-диметилбутилсульфонил, 1,2-диметилбутилсульфонил, 1,3-диметилбутилсульфонил, 2,2-диметилбутилсульфонил, 2,3-диметилбутилсульфонил, 3,3-диметилбутилсульфонил, 1-этилбутилсульфонил, 2-этилбутилсульфонил, 1,1,2-триметилпропилсульфонил, 1,2,2-триметилпропилсульфонил, 1-этил-1-метилпропилсульфонил и 1-этил-2-метилпропилсульфонил;

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

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

ди(C₁-C₄-алкил)амино: например N,N-диметиламино, N,N-диметиламино, N,N-ди(1-метилэтил)амино, N,N-дипропиламино, N,N-дибутиламино, N,N-ди(1-метилпропил)амино, N,N-ди(2-

метилпропил)амино, N,N-ди(1,1-диметилэтил)амино, N-этил-N-метиламино, N-метил-N-пропиламино, N-метил-N-(1-метилэтил)амино, N-бутил-N-метиламино, N-метил-N-(1-метилпропил)амино, N-метил-N-(2-метилпропил)амино, N-(1,1-диметилэтил)-N-метиламино, N-этил-N-пропиламино, N-этил-N-(1-метилэтил)амино, N-бутил-N-этиламино, N-этил-N-(1-метилпропил)амино, N-этил-N-(2-метилпропил)амино, N-этил-N-(1,1-диметилэтил)амино, N-(1-метилэтил)-N-пропиламино, N-бутил-N-пропиламино, N-(1-метилпропил)-N-пропиламино, N-(2-метилпропил)-N-пропиламино, N-(1,1-диметилэтил)-N-пропиламино, N-бутил-N-(1-метилэтил)амино, N-(1-метилэтил)-N-(1-метилпропил)амино, N-(1-метилэтил)-N-(2-метилпропил)амино, N-(1,1-диметилэтил)-N-(1-метилэтил)амино, N-бутил-N-(1-метилпропил)амино, N-бутил-N-(2-метилпропил)амино, N-бутил-N-(1,1-диметилэтил)амино, N-(1-метилпропил)-N-(2-метилпропил)амино, N-(1,1-диметилэтил)-N-(1-метилпропил)амино или N-(1,1-диметилэтил)-N-(2-метилпропил)амино;

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

трех-шести-членный гетероцикл: моноциклический насыщенный или частично ненасыщенный углеводород с членами углеродного кольца в количестве от трех до шести, как указывалось выше, который, помимо атомов углерода, содержит один или два гетероатома, выбранные из O, S и N;

например, 2-оксиранил, 2-оксетанил, 3-оксетанил, 2-азиринил, 3-тиетанил, 1-азетидинил, 2-азетидинил, например, 2-тетрагидрофуранил, 3-тетрагидрофуранил, 2-тетрагидротииенил, 3-тетрагидротииенил, 2-пирролидинил, 3-пирролидинил, 3-изоксазолидин, 4-изоксазолидин, 5-изоксазолидин, 3-изотиазолидинил, 4-изотиазолидинил, 5-изотиазолидинил, 3-пиразолидинил, 4-пиразолидинил, 5-пиразолидинил, 2-оксазолидинил, 4-оксазолидинил, 5-оксазолидинил, 2-тиазолидинил, 4-тиазолидинил, 5-тиазолидинил, 2-имидазолидинил, 4-имидазолидинил;

например, 2,3-дигидрофур-2-ил, 2,3-дигидрофур-3-ил, 2,4-дигидрофур-2-ил, 2,4-дигидрофур-3-ил, 2,3-дигидротииен-2-ил, 2,3-дигидротииен-3-ил, 2,4-дигидротииен-2-ил, 2,4-дигидротииен-3-ил, 4,5-дигидропиррол-2-ил, 4,5-дигидропиррол-3-ил, 2,5-дигидропиррол-2-ил, 2,5-дигидропиррол-3-ил, 4,5-дигидроизоксазол-3-ил, 2,5-дигидроизоксазол-3-ил, 2,3-дигидроизоксазол-3-ил, 4,5-дигидроизоксазол-4-ил, 2,5-дигидроизоксазол-4-ил, 2,3-дигидроизоксазол-4-ил, 4,5-дигидроизоксазол-5-ил, 2,5-дигидроизоксазол-5-ил, 2,3-дигидроизоксазол-5-ил, 4,5-дигидроизотиазол-3-ил, 2,5-дигидроизотиазол-3-ил, 2,3-дигидроизотиазол-3-ил, 4,5-дигидроизотиазол-4-ил, 2,5-дигидроизотиазол-4-ил, 2,3-дигидроизотиазол-4-ил, 4,5-дигидроизотиазол-5-ил, 2,5-дигидроизотиазол-5-ил, 2,3-дигидроизотиазол-5-ил, 2,3-дигидропиразол-2-ил, 2,3-дигидропиразол-3-ил, 2,3-дигидропиразол-4-ил, 2,3-дигидропиразол-5-ил, 3,4-дигидропиразол-3-ил, 3,4-дигидропиразол-4-ил, 3,4-дигидропиразол-5-ил, 4,5-дигидропиразол-3-ил, 4,5-дигидропиразол-4-ил, 4,5-дигидропиразол-5-ил, 2,3-дигидроимидазол-2-ил, 2,3-дигидроимидазол-3-ил, 2,3-дигидроимидазол-4-ил, 2,3-дигидроимидазол-5-ил, 4,5-дигидроимидазол-2-ил, 4,5-дигидроимидазол-4-ил, 4,5-дигидроимидазол-5-ил, 2,5-дигидроимидазол-2-ил, 2,5-дигидроимидазол-4-ил, 2,5-дигидроимидазол-5-ил, 2,3-дигидрооксазол-3-ил, 2,3-дигидрооксазол-4-ил, 2,3-дигидрооксазол-5-ил, 3,4-дигидрооксазол-3-ил, 3,4-дигидрооксазол-4-ил, 3,4-дигидрооксазол-5-ил, 2,3-дигидротиазол-3-ил, 2,3-дигидротиазол-4-ил, 2,3-дигидротиазол-5-ил, 3,4-дигидротиазол-3-ил, 3,4-дигидротиазол-4-ил, 3,4-дигидротиазол-5-ил, 3,4-дигидротиазол-2-ил, 3,4-дигидротиазол-3-ил, 3,4-дигидротиазол-4-ил; например, 2-пиперидинил, 3-пиперидинил, 4-пиперидинил, 1,3-диоксан-2-ил, 1,3-диоксан-4-ил, 1,3-диоксан-5-ил, 1,4-диоксан-2-ил, 1,3-дитиан-2-ил, 1,3-дитиан-4-ил, 1,4-дитиан-2-ил, 1,3-дитиан-5-ил, 2-тетрагидропиранил, 3-тетрагидропиранил, 4-тетрагидропиранил, 2-тетрагидротииоипиранил, 3-тетрагидротииоипиранил, 4-тетрагидро-тиоипиранил, 3-гексагидропиридазинил, 4-гексагидропиридазинил,

2-гексагидропиримидинил, 4-гексагидропиримидинил, 5-гексагидропиримидинил, 2-пиперазинил, тетрагидро-1,3-оксазин-2-ил, тетрагидро-1,3-оксазин-6-ил, 2-морфолинил, 3-морфолинил;

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

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

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

Предпочтительными являются азины формулы (I), причем А означает фенил, замещенный двумя-пятью заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-галоалкила, OH, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинила, (C₁-C₆-алкил)сульфонила, amino, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонила, (C₁-C₆-алкокси)карбонила;

в частности, предпочтительно фенил, замещенный двумя-пятью заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, C₁-C₆-алкила и C₁-C₆-алкокси;

в частности, предпочтительно выбранными из галогена и CN;

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

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

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

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

особенно предпочтительно выбранными из галогена и CN;

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

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

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

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

особенно предпочтительно выбранными из галогена и CN;

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

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

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

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

особенно предпочтительно выбранными из галогена и CN;

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

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

а также более предпочтительно фенил, замещенный четырьмя заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-галоалкила, OH, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинила, (C₁-C₆-алкил)сульфонила, amino, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонила, (C₁-C₆-алкокси)карбонила;

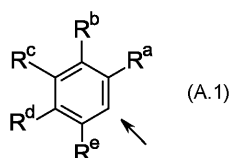
в частности, предпочтительно выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, C₁-C₆-алкила и C₁-C₆-алкокси;

особенно предпочтительно выбранными из галогена и CN;

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

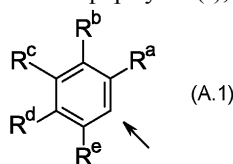
R^b , R^c и R^d означают водород;

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

R^c водород;

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

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



где R^a означает галоген или CN;

R^b и R^d означают H, галоген или CN;

R^c означает H или галоген;

R^e означает галоген, CN или C₁-C₆-алкил;

в частности, предпочтительно R^a означает галоген;

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

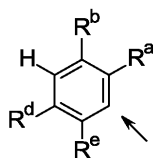
особенно предпочтительно R^a , R^b , R^d и R^e означают галоген; и

R^c означает H или галоген;

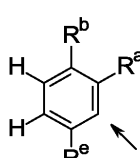
более предпочтительно R^a , R^b , R^d и R^e означают F; и

R^c означает H или F.

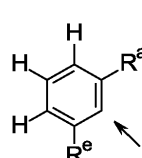
Особенно предпочтительными являются азины формулы (I), причем A выбран из группы, состоящей из (A.1.1), (A.1.2) и (A.1.3); более предпочтительно выбранными из группы, состоящей из (A.1.2) и (A.1.3);



(A.1.1)



(A.1.2)



(A.1.3)

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

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

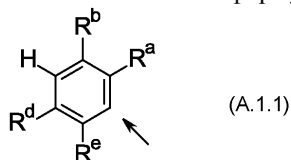
в частности, предпочтительно R^a и R^e независимо друг от друга означают галоген, CN, C₁-C₆-алкил, или C₁-C₆-алкокси; и

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

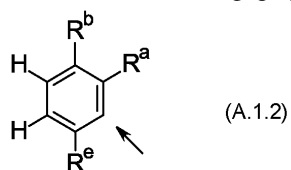
C₁-C₆-алкокси;

особенно предпочтительно R^a и R^c независимо друг от друга означают галоген или CN; и R^b и R^d независимо друг от друга означают галоген, CN, C₁-C₆-алкил или C₁-C₆-алкокси; более предпочтительно R^a и R^c означают галоген; и R^b и R^d независимо друг от друга означают галоген или CN; наиболее предпочтительно R^a, R^b, R^d и R^e означают галоген.

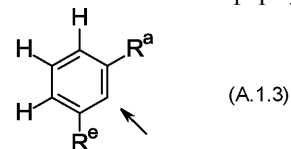
Также особенно предпочтительными являются азины формулы (I), причем А означает



где R^a, R^b, R^d и R^e имеют значения, в частности предпочтительные значения, определенные выше. Также особенно предпочтительными являются азины формулы (I), причем А означает



где R^a, R^b и R^c имеют значения, в частности, предпочтительные значения, определенные выше. Также особенно предпочтительными являются азины формулы (I), причем А означает



где R^a и R^c имеют значения, в частности предпочтительные значения, определенные выше.

Также предпочтительными являются азины формулы (I), причем А означает 2-фтор-фенил, замещенный одним-четырьмя заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-галоалкила, OH, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинила, (C₁-C₆-алкил)сульфонила, amino, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонила и (C₁-C₆-алкокси)карбонила;

в частности, предпочтительно 2-фтор-фенил, замещенный двумя-четырьмя заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, C₁-C₆-алкила и C₁-C₆-алкокси;

в частности, предпочтительно выбранными из галогена и CN;

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

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

особенно предпочтительно 2-фтор-фенил, замещенный двумя-тремя заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-галоалкила, OH, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинила, (C₁-C₆-алкил)сульфонила, amino, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонила и (C₁-C₆-алкокси)карбонила;

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

особенно предпочтительно выбранными из галогена и CN;

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

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

наиболее предпочтительно 2-фтор-фенил, замещенный одним заместителем,

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

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

особенно предпочтительно выбранными из галогена и CN;

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

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

также наиболее предпочтительно 2-фтор-фенил, замещенный двумя заместителями,

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

в частности, предпочтительно выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, C₁-C₆-алкила и

C₁-C₆-алкокси;

особенно предпочтительно выбранными из галогена и CN;

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

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

также наиболее предпочтительно 2-фтор-фенил, замещенный тремя заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-галоалкила, OH, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинила, (C₁-C₆-алкил)сульфонила, amino, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонила и (C₁-C₆-алкокси)карбонила;

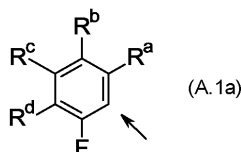
в частности, предпочтительно выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, C₁-C₆-алкила и C₁-C₆-алкокси;

особенно предпочтительно выбранными из галогена и CN;

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

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

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



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

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

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

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

особенно предпочтительно R^a означает галоген или CN; и

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

более предпочтительно R^a означает галоген; и

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

наиболее предпочтительно R^a означает галоген; и

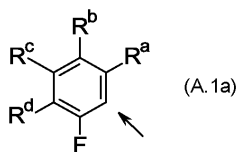
R^b, R^c и R^d означают водород;

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

R^c означает водород;

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

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



где R^c означает галоген, CN или C₁-C₆-алкил;

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

R^c означает H или галоген;

в частности, предпочтительно R^a означает галоген или CN; и

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

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

R^c означает H или галоген;

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

R^c означает H, F, Br или I;

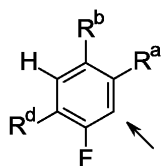
более предпочтительно R^a, R^b и R^d означают F; и

R^c означает F, Br или I;

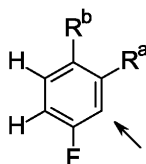
также более предпочтительно R^a, R^b и R^d означают F; и

R^c означает H или F.

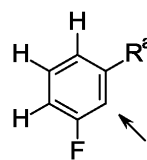
Главным образом предпочтительными являются азины формулы (I), причем А выбран из группы, состоящей из (A.1a.1), (A.1a.2) и (A.1a.3); более предпочтительно выбранными из группы, состоящей из (A.1.2) и (A.1.3);



(A.1a.1)



(A.1a.2)



(A.1a.3)

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

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

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

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

особенно предпочтительно R^a означает галоген или CN; и

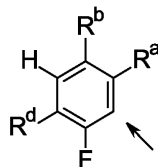
R^b и R^d независимо друг от друга означают галоген, CN, C₁-C₆-алкил или C₁-C₆-алкокси;

более предпочтительно R^a означает галоген; и

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

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

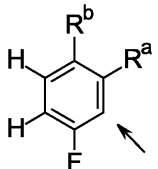
Также особенно предпочтительными являются азины формулы (I), причем А означает



(A.1a.1)

где R^a , R^b и R^d имеют значения, в частности, предпочтительные значения, определенные выше.

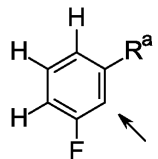
Также особенно предпочтительными являются азины формулы (I), причем А означает



(A.1a.2)

где R^a и R^b имеют значения, в частности, предпочтительные значения, определенные выше.

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



(A.1a.3)

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

Также предпочтительными являются азины формулы (I), причем R^1 означает H, CN, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галоалкил, C₁-C₆-алкокси-C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-алкокси, (C₁-C₆-алкил)карбонил или (C₁-C₆-алкил)сульфонил;

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

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

более предпочтительно водород.

Также предпочтительными являются азины формулы (I), причем R^2 означает H, галоген, C₁-C₆-алкил или C₁-C₆-галоалкил;

в частности, предпочтительно галоген, C₁-C₆-алкил или C₁-C₆-галоалкил;

также, в частности, предпочтительно H, F, Cl, CH₃ или CF₃.

Также предпочтительными являются азины формулы (I), причем R^3 и R^4 означают независимо друг от друга, галоген, C₁-C₆-алкил или C₁-C₆-галоалкил; или

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

С₃-С₆-циклоалкил, С₃-С₆-циклоалкенил или трех-шести-членный гетероцикл не замещены или замещены одним -тремь заместителями, выбранными из галогена, CN, С₁-С₆-алкила и С₁-С₆-алкокси;

независимо друг от друга, в частности, предпочтительно Н, галоген, С₁-С₆-алкил или С₁-С₆-галоалкил; или

вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют фрагмент, выбранный из группы, состоящей из С₃-С₆-циклоалкила и С₃-С₆-циклоалкенила, где С₃-С₆-циклоалкил или С₃-С₆-циклоалкенил не замещены или замещены одним-тремь заместителями, выбранными из галогена, CN, С₁-С₆-алкила и С₁-С₆-алкокси;

независимо друг от друга, особенно предпочтительно Н, галоген, С₁-С₆-алкил или С₁-С₆-галоалкил;

независимо друг от друга, более предпочтительно Н, галоген или С₁-С₆-алкил.

Также предпочтительными являются азины формулы (I), причем R² означает Н, галоген, С₁-С₆-алкил; и

R³ и R⁴ означают независимо друг от друга Н, галоген, С₁-С₆-алкил или вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют С₃-С₆-циклоалкил;

в частности, предпочтительно R² означает Н, галоген или С₁-С₆-алкил;

R³ означает С₁-С₆-алкил;

R⁴ означает Н, галоген или С₁-С₆-алкил;

R³ и R⁴ вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют С₃-С₆-циклоалкил;

особенно предпочтительно R² означает галоген или С₁-С₆-алкил;

R³ означает С₁-С₆-алкил;

R⁴ означает Н или С₁-С₆-алкил;

более предпочтительно R² означает галоген; и

R³ и R⁴ означают С₁-С₆-алкил.

Также предпочтительными являются азины формулы (I), причем R⁵ означает Н, CN, С₁-С₆-алкил, С₁-С₆-галоалкил, С₁-С₆-алкокси-С₁-С₆-алкил, С₁-С₆-алкокси, (С₁-С₆-алкил)карбонил или (С₁-С₆-алкил)сульфонил;

в частности, предпочтительно Н, CN, С₁-С₆-алкил, С₁-С₆-алкокси-С₁-С₆-алкил, С₁-С₆-алкокси, (С₁-С₆-алкил)карбонил или (С₁-С₆-алкил)сульфонил;

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

более предпочтительно водород.

Также предпочтительными являются азины формулы (I), причем А означает фенил, замещенный двумя-пятью заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, С₁-С₆-алкил и С₁-С₆-алкокси;

в частности, предпочтительно выбранными из галогена и CN;

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

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

в частности, предпочтительно фенил, замещенный двумя-четырьмя заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, С₁-С₆-алкила, С₁-С₆-галоалкила, OH, С₁-С₆-алкокси, С₁-С₆-алкилтио, (С₁-С₆-алкил)сульфинила, (С₁-С₆-алкил)сульфонила, amino, (С₁-С₆-алкил)амино, ди(С₁-С₆-алкил)амино, (С₁-С₆-алкил)карбонила, (С₁-С₆-алкокси)карбонила;

в частности, предпочтительно выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, С₁-С₆-алкила и С₁-С₆-алкокси;

особенно предпочтительно выбранными из галогена и CN;

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

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

особенно предпочтительно фенил, замещенный двумя заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, С₁-С₆-алкила, С₁-С₆-галоалкила, OH, С₁-С₆-алкокси, С₁-С₆-алкилтио, (С₁-С₆-алкил)сульфинила, (С₁-С₆-алкил)сульфонила, amino, (С₁-С₆-алкил)амино, ди(С₁-С₆-алкил)амино, (С₁-С₆-алкил)карбонила, (С₁-С₆-алкокси)карбонила;

в частности, предпочтительно выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, С₁-С₆-алкила и С₁-С₆-алкокси;

особенно предпочтительно выбранными из галогена и CN;

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

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

также особенно предпочтительно фенил, замещенный тремя заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, С₁-С₆-алкила, С₁-С₆-галоалкила, OH, С₁-С₆-алкокси, С₁-С₆-алкилтио, (С₁-С₆-алкил)сульфинила, (С₁-С₆-алкил)сульфонила, amino, (С₁-С₆-алкил)амино, ди(С₁-С₆-алкил)амино, (С₁-С₆-алкил)карбонила, (С₁-С₆-алкокси)карбониа;

в частности, предпочтительно выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, С₁-С₆-алкила и С₁-С₆-алкокси;

особенно предпочтительно выбранными из галогена и CN;

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

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

также более предпочтительно фенил, замещенный четырьмя заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, NO₂, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-галоалкила, OH, C₁-C₆-алкокси, C₁-C₆-алкилтио, (C₁-C₆-алкил)сульфинила, (C₁-C₆-алкил)сульфонилла, amino, (C₁-C₆-алкил)амино, ди(C₁-C₆-алкил)амино, (C₁-C₆-алкил)карбонилла, (C₁-C₆-алкокси)карбонилла;

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

особенно предпочтительно выбранными из галогена и CN;

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

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

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

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

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

более предпочтительно водород.

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

в частности, предпочтительно галоген, C₁-C₆-алкил или C₁-C₆-галоалкил;

также, в частности, предпочтительно H, F, CH₃ или CF₃;

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

вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют фрагмент, выбранный из группы, состоящей из C₃-C₆-циклоалкила, C₃-C₆-циклоалкенила и трех-шести-членного гетероциклила, где C₃-C₆-циклоалкил, C₃-C₆-циклоалкенил или трех-шести-членный гетероциклил не замещены или замещены одним – тремя заместителями, выбранными из галогена, CN, C₁-C₆-алкила и C₁-C₆-алкокси;

независимо друг от друга, в частности, предпочтительно H, галоген, C₁-C₆-алкил или C₁-C₆-галоалкил; или

вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют фрагмент, выбранный из группы, состоящей из C₃-C₆-циклоалкила и C₃-C₆-циклоалкенила, где C₃-C₆-циклоалкил или C₃-C₆-циклоалкенил не замещены или замещены одним-тремя заместителями, выбранными из галогена, CN, C₁-C₆-алкила и C₁-C₆-алкокси;

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

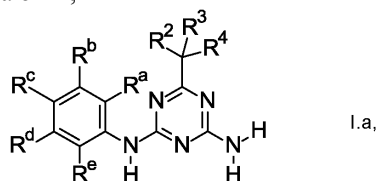
независимо друг от друга, более предпочтительно H, галоген или C₁-C₆-алкил; и

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

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

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

Особое предпочтение отдается азидам формулы (Ia), которые соответствуют азидам формулы (I), где A означает (A.1), а R¹ и R⁵ означают H,



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

особое предпочтение отдается азидам формул (I.a. 1)-(I.a. 1406), приведенным в табл. А, где определения переменных R^a, R^b, R^c, R^d, R^e, R², R³ и R⁴ имеют особое значение для соединений согласно данному изобретению не только в комбинации друг с другом, но также в каждом случае по отдельности.

Таблица А

№	R ^a	R ^b	R ^c	R ^d	R ^e	R ²	R ³	R ⁴
l.a.1	F	H	H	H	F	CH ₃	H	H
l.a.2	Cl	H	H	H	F	CH ₃	H	H
l.a.3	Br	H	H	H	F	CH ₃	H	H
l.a.4	CN	H	H	H	F	CH ₃	H	H
l.a.5	CH ₃	H	H	H	F	CH ₃	H	H
l.a.6	F	H	H	F	F	CH ₃	H	H
l.a.7	Cl	H	H	F	F	CH ₃	H	H
l.a.8	F	H	H	Cl	F	CH ₃	H	H
l.a.9	Cl	H	H	F	F	CH ₃	H	H
l.a.10	CN	H	H	F	F	CH ₃	H	H
l.a.11	F	H	H	CN	F	CH ₃	H	H
l.a.12	CN	H	H	F	F	CH ₃	H	H
l.a.13	F	H	F	H	F	CH ₃	H	H
l.a.14	Cl	H	F	H	F	CH ₃	H	H
l.a.15	CN	H	F	H	F	CH ₃	H	H
l.a.16	F	F	F	H	F	CH ₃	H	H
l.a.17	Cl	F	F	H	F	CH ₃	H	H
l.a.18	F	Cl	F	H	F	CH ₃	H	H
l.a.19	Cl	F	F	H	F	CH ₃	H	H
l.a.20	CN	F	F	H	F	CH ₃	H	H
l.a.21	F	CN	F	H	F	CH ₃	H	H
l.a.22	CN	F	F	H	F	CH ₃	H	H
l.a.23	F	F	H	F	F	CH ₃	H	H
l.a.24	Cl	F	H	F	F	CH ₃	H	H
l.a.25	F	Cl	H	F	F	CH ₃	H	H
l.a.26	CN	F	H	F	F	CH ₃	H	H
l.a.27	F	CN	H	F	F	CH ₃	H	H
l.a.28	F	F	F	F	F	CH ₃	H	H
l.a.29	Cl	F	F	F	F	CH ₃	H	H
l.a.30	F	Cl	F	F	F	CH ₃	H	H
l.a.31	CN	F	F	F	F	CH ₃	H	H
l.a.32	F	CN	F	F	F	CH ₃	H	H

l.a.33	H	F	F	F	F	CH ₃	H	H
l.a.34	F	F	Br	F	F	CH ₃	H	H
l.a.35	F	F	C≡CH	F	F	CH ₃	H	H
l.a.36	CF ₃	Cl	H	H	F	CH ₃	H	H
l.a.37	F	F	I	F	F	CH ₃	H	H
l.a.38	F	H	H	H	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.39	Cl	H	H	H	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.40	Br	H	H	H	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.41	CN	H	H	H	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.42	CH ₃	H	H	H	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.43	F	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.44	Cl	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.45	F	H	H	Cl	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.46	Cl	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.47	CN	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.48	F	H	H	CN	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.49	CN	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.50	F	H	F	H	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.51	Cl	H	F	H	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.52	CN	H	F	H	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.53	F	F	F	H	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.54	Cl	F	F	H	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.55	F	Cl	F	H	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.56	Cl	F	F	H	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.57	CN	F	F	H	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.58	F	CN	F	H	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.59	CN	F	F	H	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.60	F	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.61	Cl	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.62	F	Cl	H	F	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.63	CN	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.64	F	CN	H	F	F	CH ₃	CH ₃	H

l.a.65	F	F	F	F	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.66	Cl	F	F	F	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.67	F	Cl	F	F	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.68	CN	F	F	F	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.69	F	CN	F	F	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.70	H	F	F	F	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.71	F	F	Br	F	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.72	F	F	C≡CH	F	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.73	CF ₃	Cl	H	H	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.74	F	F	I	F	F	CH ₃	CH ₃	H
l.a.75	F	H	H	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.76	Cl	H	H	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.77	Br	H	H	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.78	CN	H	H	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.79	CH ₃	H	H	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.80	F	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.81	Cl	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.82	F	H	H	Cl	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.83	Cl	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.84	CN	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.85	F	H	H	CN	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.86	CN	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.87	F	H	F	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.88	Cl	H	F	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.89	CN	H	F	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.90	F	F	F	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃

l.a.91	Cl	F	F	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.92	F	Cl	F	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.93	Cl	F	F	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.94	CN	F	F	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.95	F	CN	F	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.96	CN	F	F	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.97	F	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.98	Cl	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.99	F	Cl	H	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.100	CN	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.101	F	CN	H	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.102	F	F	F	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.103	Cl	F	F	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.104	F	Cl	F	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.105	CN	F	F	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.106	F	CN	F	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.107	H	F	F	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.108	F	F	Br	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.109	F	F	C≡CH	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.110	CF ₃	Cl	H	H	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.111	F	F	I	F	F	CH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.112	F	H	H	H	F	F	F	F
l.a.113	Cl	H	H	H	F	F	F	F
l.a.114	Br	H	H	H	F	F	F	F
l.a.115	CN	H	H	H	F	F	F	F
l.a.116	CH ₃	H	H	H	F	F	F	F

l.a.117	F	H	H	F	F	F	F	F
l.a.118	Cl	H	H	F	F	F	F	F
l.a.119	F	H	H	Cl	F	F	F	F
l.a.120	Cl	H	H	F	F	F	F	F
l.a.121	CN	H	H	F	F	F	F	F
l.a.122	F	H	H	CN	F	F	F	F
l.a.123	CN	H	H	F	F	F	F	F
l.a.124	F	H	F	H	F	F	F	F
l.a.125	Cl	H	F	H	F	F	F	F
l.a.126	CN	H	F	H	F	F	F	F
l.a.127	F	F	F	H	F	F	F	F
l.a.128	Cl	F	F	H	F	F	F	F
l.a.129	F	Cl	F	H	F	F	F	F
l.a.130	Cl	F	F	H	F	F	F	F
l.a.131	CN	F	F	H	F	F	F	F
l.a.132	F	CN	F	H	F	F	F	F
l.a.133	CN	F	F	H	F	F	F	F
l.a.134	F	F	H	F	F	F	F	F
l.a.135	Cl	F	H	F	F	F	F	F
l.a.136	F	Cl	H	F	F	F	F	F
l.a.137	CN	F	H	F	F	F	F	F
l.a.138	F	CN	H	F	F	F	F	F
l.a.139	F	F	F	F	F	F	F	F
l.a.140	Cl	F	F	F	F	F	F	F
l.a.141	F	Cl	F	F	F	F	F	F
l.a.142	CN	F	F	F	F	F	F	F

I.a.143	F	CN	F	F	F	F	F	F
I.a.144	H	F	F	F	F	F	F	F
I.a.145	F	F	Br	F	F	F	F	F
I.a.146	F	F	C≡CH	F	F	F	F	F
I.a.147	CF ₃	Cl	H	H	F	F	F	F
I.a.148	F	F	I	F	F	F	F	F
I.a.149	F	H	H	H	F	F	CF ₃	F
I.a.150	Cl	H	H	H	F	F	CF ₃	F
I.a.151	Br	H	H	H	F	F	CF ₃	F
I.a.152	CN	H	H	H	F	F	CF ₃	F
I.a.153	CH ₃	H	H	H	F	F	CF ₃	F
I.a.154	F	H	H	F	F	F	CF ₃	F
I.a.155	Cl	H	H	F	F	F	CF ₃	F
I.a.156	F	H	H	Cl	F	F	CF ₃	F
I.a.157	Cl	H	H	F	F	F	CF ₃	F
I.a.158	CN	H	H	F	F	F	CF ₃	F
I.a.159	F	H	H	CN	F	F	CF ₃	F
I.a.160	CN	H	H	F	F	F	CF ₃	F
I.a.161	F	H	F	H	F	F	CF ₃	F
I.a.162	Cl	H	F	H	F	F	CF ₃	F
I.a.163	CN	H	F	H	F	F	CF ₃	F
I.a.164	F	F	F	H	F	F	CF ₃	F
I.a.165	Cl	F	F	H	F	F	CF ₃	F
I.a.166	F	Cl	F	H	F	F	CF ₃	F
I.a.167	Cl	F	F	H	F	F	CF ₃	F
I.a.168	CN	F	F	H	F	F	CF ₃	F

l.a.169	F	CN	F	H	F	F	CF ₃	F
l.a.170	CN	F	F	H	F	F	CF ₃	F
l.a.171	F	F	H	F	F	F	CF ₃	F
l.a.172	Cl	F	H	F	F	F	CF ₃	F
l.a.173	F	Cl	H	F	F	F	CF ₃	F
l.a.174	CN	F	H	F	F	F	CF ₃	F
l.a.175	F	CN	H	F	F	F	CF ₃	F
l.a.176	F	F	F	F	F	F	CF ₃	F
l.a.177	Cl	F	F	F	F	F	CF ₃	F
l.a.178	F	Cl	F	F	F	F	CF ₃	F
l.a.179	CN	F	F	F	F	F	CF ₃	F
l.a.180	F	CN	F	F	F	F	CF ₃	F
l.a.181	H	F	F	F	F	F	CF ₃	F
l.a.182	F	F	Br	F	F	F	CF ₃	F
l.a.183	F	F	C≡CH	F	F	F	CF ₃	F
l.a.184	CF ₃	Cl	H	H	F	F	CF ₃	F
l.a.185	F	F	I	F	F	F	CF ₃	F
l.a.186	F	H	H	H	F	F	CH ₃	F
l.a.187	Cl	H	H	H	F	F	CH ₃	F
l.a.188	Br	H	H	H	F	F	CH ₃	F
l.a.189	CN	H	H	H	F	F	CH ₃	F
l.a.190	CH ₃	H	H	H	F	F	CH ₃	F
l.a.191	F	H	H	F	F	F	CH ₃	F
l.a.192	Cl	H	H	F	F	F	CH ₃	F
l.a.193	F	H	H	Cl	F	F	CH ₃	F
l.a.194	Cl	H	H	F	F	F	CH ₃	F

l.a.195	CN	H	H	F	F	F	CH ₃	F
l.a.196	F	H	H	CN	F	F	CH ₃	F
l.a.197	CN	H	H	F	F	F	CH ₃	F
l.a.198	F	H	F	H	F	F	CH ₃	F
l.a.199	Cl	H	F	H	F	F	CH ₃	F
l.a.200	CN	H	F	H	F	F	CH ₃	F
l.a.201	F	F	F	H	F	F	CH ₃	F
l.a.202	Cl	F	F	H	F	F	CH ₃	F
l.a.203	F	Cl	F	H	F	F	CH ₃	F
l.a.204	Cl	F	F	H	F	F	CH ₃	F
l.a.205	CN	F	F	H	F	F	CH ₃	F
l.a.206	F	CN	F	H	F	F	CH ₃	F
l.a.207	CN	F	F	H	F	F	CH ₃	F
l.a.208	F	F	H	F	F	F	CH ₃	F
l.a.209	Cl	F	H	F	F	F	CH ₃	F
l.a.210	F	Cl	H	F	F	F	CH ₃	F
l.a.211	CN	F	H	F	F	F	CH ₃	F
l.a.212	F	CN	H	F	F	F	CH ₃	F
l.a.213	F	F	F	F	F	F	CH ₃	F
l.a.214	Cl	F	F	F	F	F	CH ₃	F
l.a.215	F	Cl	F	F	F	F	CH ₃	F
l.a.216	CN	F	F	F	F	F	CH ₃	F
l.a.217	F	CN	F	F	F	F	CH ₃	F
l.a.218	H	F	F	F	F	F	CH ₃	F
l.a.219	F	F	Br	F	F	F	CH ₃	F
l.a.220	F	F	C≡CH	F	F	F	CH ₃	F

l.a.221	CF ₃	Cl	H	H	F	F	CH ₃	F
l.a.222	F	F	I	F	F	F	CH ₃	F
l.a.223	F	H	H	H	F	F	CH ₃	H
l.a.224	Cl	H	H	H	F	F	CH ₃	H
l.a.225	Br	H	H	H	F	F	CH ₃	H
l.a.226	CN	H	H	H	F	F	CH ₃	H
l.a.227	CH ₃	H	H	H	F	F	CH ₃	H
l.a.228	F	H	H	F	F	F	CH ₃	H
l.a.229	Cl	H	H	F	F	F	CH ₃	H
l.a.230	F	H	H	Cl	F	F	CH ₃	H
l.a.231	Cl	H	H	F	F	F	CH ₃	H
l.a.232	CN	H	H	F	F	F	CH ₃	H
l.a.233	F	H	H	CN	F	F	CH ₃	H
l.a.234	CN	H	H	F	F	F	CH ₃	H
l.a.235	F	H	F	H	F	F	CH ₃	H
l.a.236	Cl	H	F	H	F	F	CH ₃	H
l.a.237	CN	H	F	H	F	F	CH ₃	H
l.a.238	F	F	F	H	F	F	CH ₃	H
l.a.239	Cl	F	F	H	F	F	CH ₃	H
l.a.240	F	Cl	F	H	F	F	CH ₃	H
l.a.241	Cl	F	F	H	F	F	CH ₃	H
l.a.242	CN	F	F	H	F	F	CH ₃	H
l.a.243	F	CN	F	H	F	F	CH ₃	H
l.a.244	CN	F	F	H	F	F	CH ₃	H
l.a.245	F	F	H	F	F	F	CH ₃	H
l.a.246	Cl	F	H	F	F	F	CH ₃	H

l.a.247	F	Cl	H	F	F	F	CH ₃	H
l.a.248	CN	F	H	F	F	F	CH ₃	H
l.a.249	F	CN	H	F	F	F	CH ₃	H
l.a.250	F	F	F	F	F	F	CH ₃	H
l.a.251	Cl	F	F	F	F	F	CH ₃	H
l.a.252	F	Cl	F	F	F	F	CH ₃	H
l.a.253	CN	F	F	F	F	F	CH ₃	H
l.a.254	F	CN	F	F	F	F	CH ₃	H
l.a.255	H	F	F	F	F	F	CH ₃	H
l.a.256	F	F	Br	F	F	F	CH ₃	H
l.a.257	F	F	C≡CH	F	F	F	CH ₃	H
l.a.258	CF ₃	Cl	H	H	F	F	CH ₃	H
l.a.259	F	F	I	F	F	F	CH ₃	H
l.a.260	F	H	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.261	Cl	H	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.262	Br	H	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.263	CN	H	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.264	CH ₃	H	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.265	F	H	H	F	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.266	Cl	H	H	F	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.267	F	H	H	Cl	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.268	Cl	H	H	F	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.269	CN	H	H	F	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.270	F	H	H	CN	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.271	CN	H	H	F	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.272	F	H	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃

l.a.273	Cl	H	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.274	CN	H	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.275	F	F	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.276	Cl	F	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.277	F	Cl	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.278	Cl	F	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.279	CN	F	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.280	F	CN	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.281	CN	F	F	H	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.282	F	F	H	F	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.283	Cl	F	H	F	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.284	F	Cl	H	F	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.285	CN	F	H	F	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.286	F	CN	H	F	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.287	F	F	F	F	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.288	Cl	F	F	F	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.289	F	Cl	F	F	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.290	CN	F	F	F	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.291	F	CN	F	F	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.292	H	F	F	F	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.293	F	F	Br	F	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.294	F	F	C≡CH	F	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.295	CF ₃	Cl	H	H	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.296	F	F	I	F	F	F	CH ₃	CH ₃
l.a.297	F	H	H	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.298	Cl	H	H	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃

l.a.299	Br	H	H	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.300	CN	H	H	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.301	CH ₃	H	H	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.302	F	H	H	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.303	Cl	H	H	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.304	F	H	H	Cl	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.305	Cl	H	H	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.306	CN	H	H	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.307	F	H	H	CN	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.308	CN	H	H	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.309	F	H	F	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.310	Cl	H	F	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.311	CN	H	F	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.312	F	F	F	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.313	Cl	F	F	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.314	F	Cl	F	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.315	Cl	F	F	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.316	CN	F	F	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.317	F	CN	F	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.318	CN	F	F	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.319	F	F	H	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.320	Cl	F	H	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.321	F	Cl	H	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.322	CN	F	H	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.323	F	CN	H	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.324	F	F	F	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃

l.a.325	Cl	F	F	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.326	F	Cl	F	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.327	CN	F	F	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.328	F	CN	F	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.329	H	F	F	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.330	F	F	Br	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.331	F	F	C≡CH	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.332	CF ₃	Cl	H	H	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.333	F	F	I	F	F	Cl	CH ₃	CH ₃
l.a.334	F	H	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.335	Cl	H	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.336	Br	H	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.337	CN	H	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.338	CH ₃	H	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.339	F	H	H	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.340	Cl	H	H	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.341	F	H	H	Cl	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.342	Cl	H	H	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.343	CN	H	H	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.344	F	H	H	CN	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.345	CN	H	H	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.346	F	H	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.347	Cl	H	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.348	CN	H	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.349	F	F	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.350	Cl	F	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃

l.a.351	F	Cl	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.352	Cl	F	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.353	CN	F	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.354	F	CN	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.355	CN	F	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.356	F	F	H	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.357	Cl	F	H	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.358	F	Cl	H	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.359	CN	F	H	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.360	F	CN	H	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.361	F	F	F	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.362	Cl	F	F	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.363	F	Cl	F	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.364	CN	F	F	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.365	F	CN	F	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.366	H	F	F	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.367	F	F	Br	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.368	F	F	C≡CH	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.369	CF ₃	Cl	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.370	F	F	I	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.371	F	H	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.372	Cl	H	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.373	Br	H	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.374	CN	H	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.375	CH ₃	H	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.376	F	H	H	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅

l.a.377	Cl	H	H	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.378	F	H	H	Cl	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.379	Cl	H	H	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.380	CN	H	H	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.381	F	H	H	CN	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.382	CN	H	H	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.383	F	H	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.384	Cl	H	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.385	CN	H	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.386	F	F	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.387	Cl	F	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.388	F	Cl	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.389	Cl	F	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.390	CN	F	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.391	F	CN	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.392	CN	F	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.393	F	F	H	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.394	Cl	F	H	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.395	F	Cl	H	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.396	CN	F	H	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.397	F	CN	H	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.398	F	F	F	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.399	Cl	F	F	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.400	F	Cl	F	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.401	CN	F	F	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.402	F	CN	F	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅

l.a.403	H	F	F	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.404	F	F	Br	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.405	F	F	C≡CH	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.406	CF ₃	Cl	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.407	F	F	I	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
l.a.408	F	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
l.a.409	Cl	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
l.a.410	Br	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
l.a.411	CN	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
l.a.412	CH ₃	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
l.a.413	F	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
l.a.414	Cl	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
l.a.415	F	H	H	Cl	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
l.a.416	Cl	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
l.a.417	CN	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
l.a.418	F	H	H	CN	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
l.a.419	CN	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
l.a.420	F	H	F	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
l.a.421	Cl	H	F	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
l.a.422	CN	H	F	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
l.a.423	F	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
l.a.424	Cl	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
l.a.425	F	Cl	F	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
l.a.426	Cl	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
l.a.427	CN	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	
l.a.428	F	CN	F	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -	

l.a.429	CN	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -
l.a.430	F	F	H	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -
l.a.431	Cl	F	H	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -
l.a.432	F	Cl	H	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -
l.a.433	CN	F	H	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -
l.a.434	F	CN	H	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -
l.a.435	F	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -
l.a.436	Cl	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -
l.a.437	F	Cl	F	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -
l.a.438	CN	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -
l.a.439	F	CN	F	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -
l.a.440	H	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -
l.a.441	F	F	Br	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -
l.a.442	F	F	C≡CH	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -
l.a.443	CF ₃	Cl	H	H	F	H	-(CH ₂) ₂ -
l.a.444	F	F	I	F	F	H	-(CH ₂) ₂ -
l.a.445	F	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.446	Cl	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.447	Br	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.448	CN	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.449	CH ₃	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.450	F	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.451	Cl	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.452	F	H	H	Cl	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.453	Cl	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.454	CN	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -

l.a.455	F	H	H	CN	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.456	CN	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.457	F	H	F	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.458	Cl	H	F	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.459	CN	H	F	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.460	F	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.461	Cl	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.462	F	Cl	F	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.463	Cl	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.464	CN	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.465	F	CN	F	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.466	CN	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.467	F	F	H	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.468	Cl	F	H	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.469	F	Cl	H	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.470	CN	F	H	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.471	F	CN	H	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.472	F	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.473	Cl	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.474	F	Cl	F	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.475	CN	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.476	F	CN	F	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.477	H	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.478	F	F	Br	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.479	F	F	C≡CH	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.480	CF ₃	Cl	H	H	F	H	-(CH ₂) ₃ -

l.a.481	F	F	I	F	F	H	-(CH ₂) ₃ -
l.a.482	F	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.483	Cl	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.484	Br	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.485	CN	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.486	CH ₃	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.487	F	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.488	Cl	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.489	F	H	H	Cl	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.490	Cl	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.491	CN	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.492	F	H	H	CN	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.493	CN	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.494	F	H	F	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.495	Cl	H	F	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.496	CN	H	F	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.497	F	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.498	Cl	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.499	F	Cl	F	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.500	Cl	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.501	CN	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.502	F	CN	F	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.503	CN	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.504	F	F	H	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.505	Cl	F	H	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.506	F	Cl	H	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -

l.a.507	CN	F	H	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.508	F	CN	H	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.509	F	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.510	Cl	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.511	F	Cl	F	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.512	CN	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.513	F	CN	F	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.514	H	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.515	F	F	Br	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.516	F	F	C≡CH	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.517	CF ₃	Cl	H	H	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.518	F	F	I	F	F	H	-(CH ₂) ₄ -
l.a.519	F	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.520	Cl	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.521	Br	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.522	CN	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.523	CH ₃	H	H	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.524	F	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.525	Cl	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.526	F	H	H	Cl	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.527	Cl	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.528	CN	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.529	F	H	H	CN	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.530	CN	H	H	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.531	F	H	F	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.532	Cl	H	F	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -

l.a.533	CN	H	F	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.534	F	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.535	Cl	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.536	F	Cl	F	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.537	Cl	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.538	CN	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.539	F	CN	F	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.540	CN	F	F	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.541	F	F	H	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.542	Cl	F	H	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.543	F	Cl	H	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.544	CN	F	H	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.545	F	CN	H	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.546	F	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.547	Cl	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.548	F	Cl	F	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.549	CN	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.550	F	CN	F	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.551	H	F	F	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.552	F	F	Br	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.553	F	F	C≡CH	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.554	CF ₃	Cl	H	H	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.555	F	F	I	F	F	H	-(CH ₂) ₅ -
l.a.556	F	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.557	Cl	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.558	Br	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -

l.a.559	CN	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.560	CH ₃	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.561	F	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.562	Cl	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.563	F	H	H	Cl	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.564	Cl	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.565	CN	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.566	F	H	H	CN	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.567	CN	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.568	F	H	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.569	Cl	H	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.570	CN	H	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.571	F	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.572	Cl	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.573	F	Cl	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.574	Cl	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.575	CN	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.576	F	CN	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.577	CN	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.578	F	F	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.579	Cl	F	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.580	F	Cl	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.581	CN	F	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.582	F	CN	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.583	F	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.584	Cl	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.585	F	Cl	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -

l.a.586	CN	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.587	F	CN	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.588	H	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.589	F	F	Br	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.590	F	F	C≡CH	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.591	CF ₃	Cl	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.592	F	F	I	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -
l.a.593	F	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.594	Cl	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.595	Br	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.596	CN	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.597	CH ₃	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.598	F	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.599	Cl	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.600	F	H	H	Cl	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.601	Cl	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.602	CN	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.603	F	H	H	CN	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.604	CN	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.605	F	H	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.606	Cl	H	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.607	CN	H	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.608	F	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.609	Cl	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.610	F	Cl	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.611	Cl	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.612	CN	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -

l.a.613	F	CN	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.614	CN	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.615	F	F	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.616	Cl	F	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.617	F	Cl	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.618	CN	F	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.619	F	CN	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.620	F	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.621	Cl	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.622	F	Cl	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.623	CN	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.624	F	CN	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.625	H	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.626	F	F	Br	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.627	F	F	C≡CH	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.628	CF ₃	Cl	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.629	F	F	I	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -
l.a.630	F	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.631	Cl	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.632	Br	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.633	CN	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.634	CH ₃	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.635	F	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.636	Cl	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.637	F	H	H	Cl	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.638	Cl	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.639	CN	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -

l.a.640	F	H	H	CN	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.641	CN	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.642	F	H	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.643	Cl	H	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.644	CN	H	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.645	F	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.646	Cl	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.647	F	Cl	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.648	Cl	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.649	CN	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.650	F	CN	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.651	CN	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.652	F	F	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.653	Cl	F	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.654	F	Cl	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.655	CN	F	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.656	F	CN	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.657	F	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.658	Cl	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.659	F	Cl	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.660	CN	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.661	F	CN	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.662	H	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.663	F	F	Br	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.664	F	F	C≡CH	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.665	CF ₃	Cl	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -
l.a.666	F	F	I	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -

l.a.667	F	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.668	Cl	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.669	Br	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.670	CN	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.671	CH ₃	H	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.672	F	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.673	Cl	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.674	F	H	H	Cl	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.675	Cl	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.676	CN	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.677	F	H	H	CN	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.678	CN	H	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.679	F	H	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.680	Cl	H	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.681	CN	H	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.682	F	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.683	Cl	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.684	F	Cl	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.685	Cl	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.686	CN	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.687	F	CN	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.688	CN	F	F	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.689	F	F	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.690	Cl	F	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.691	F	Cl	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.692	CN	F	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.693	F	CN	H	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -

l.a.694	F	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.695	Cl	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.696	F	Cl	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.697	CN	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.698	F	CN	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.699	H	F	F	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.700	F	F	Br	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.701	F	F	C≡CH	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.702	CF ₃	Cl	H	H	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.703	F	F	I	F	F	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
l.a.704	F	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.705	Cl	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.706	Br	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.707	CN	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.708	CH ₃	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.709	F	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.710	Cl	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.711	F	H	H	Cl	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.712	Cl	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.713	CN	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.714	F	H	H	CN	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.715	CN	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.716	F	H	F	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.717	Cl	H	F	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.718	CN	H	F	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.719	F	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.720	Cl	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -

l.a.721	F	Cl	F	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.722	Cl	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.723	CN	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.724	F	CN	F	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.725	CN	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.726	F	F	H	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.727	Cl	F	H	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.728	F	Cl	H	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.729	CN	F	H	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.730	F	CN	H	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.731	F	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.732	Cl	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.733	F	Cl	F	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.734	CN	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.735	F	CN	F	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.736	H	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.737	F	F	Br	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.738	F	F	C≡CH	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.739	CF ₃	Cl	H	H	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.740	F	F	I	F	F	F	-(CH ₂) ₂ -
l.a.741	F	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.742	Cl	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.743	Br	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.744	CN	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.745	CH ₃	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.746	F	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.747	Cl	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -

l.a.748	F	H	H	Cl	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.749	Cl	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.750	CN	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.751	F	H	H	CN	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.752	CN	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.753	F	H	F	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.754	Cl	H	F	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.755	CN	H	F	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.756	F	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.757	Cl	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.758	F	Cl	F	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.759	Cl	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.760	CN	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.761	F	CN	F	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.762	CN	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.763	F	F	H	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.764	Cl	F	H	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.765	F	Cl	H	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.766	CN	F	H	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.767	F	CN	H	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.768	F	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.769	Cl	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.770	F	Cl	F	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.771	CN	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.772	F	CN	F	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.773	H	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.774	F	F	Br	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -

l.a.775	F	F	C≡CH	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.776	CF ₃	Cl	H	H	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.777	F	F	I	F	F	F	-(CH ₂) ₃ -
l.a.778	F	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.779	Cl	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.780	Br	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.781	CN	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.782	CH ₃	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.783	F	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.784	Cl	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.785	F	H	H	Cl	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.786	Cl	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.787	CN	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.788	F	H	H	CN	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.789	CN	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.790	F	H	F	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.791	Cl	H	F	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.792	CN	H	F	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.793	F	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.794	Cl	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.795	F	Cl	F	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.796	Cl	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.797	CN	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.798	F	CN	F	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.799	CN	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.800	F	F	H	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -

l.a.801	Cl	F	H	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.802	F	Cl	H	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.803	CN	F	H	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.804	F	CN	H	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.805	F	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.806	Cl	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.807	F	Cl	F	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.808	CN	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.809	F	CN	F	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.810	H	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.811	F	F	Br	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.812	F	F	C≡CH	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.813	CF ₃	Cl	H	H	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.814	F	F	I	F	F	F	-(CH ₂) ₄ -
l.a.815	F	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.816	Cl	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.817	Br	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.818	CN	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.819	CH ₃	H	H	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.820	F	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.821	Cl	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.822	F	H	H	Cl	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.823	Cl	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.824	CN	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.825	F	H	H	CN	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.826	CN	H	H	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.827	F	H	F	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -

l.a.828	Cl	H	F	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.829	CN	H	F	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.830	F	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.831	Cl	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.832	F	Cl	F	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.833	Cl	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.834	CN	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.835	F	CN	F	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.836	CN	F	F	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.837	F	F	H	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.838	Cl	F	H	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.839	F	Cl	H	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.840	CN	F	H	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.841	F	CN	H	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.842	F	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.843	Cl	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.844	F	Cl	F	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.845	CN	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.846	F	CN	F	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.847	H	F	F	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.848	F	F	Br	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.849	F	F	C≡CH	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.850	CF ₃	Cl	H	H	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.851	F	F	I	F	F	F	-(CH ₂) ₅ -
l.a.852	F	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
l.a.853	Cl	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
l.a.854	Br	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -

l.a.855	CN	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
l.a.856	CH ₃	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
l.a.857	F	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
l.a.858	Cl	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
l.a.859	F	H	H	Cl	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
l.a.860	Cl	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
l.a.861	CN	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
l.a.862	F	H	H	CN	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
l.a.863	CN	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
l.a.864	F	H	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
l.a.865	Cl	H	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
l.a.866	CN	H	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
l.a.867	F	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
l.a.868	Cl	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
l.a.869	F	Cl	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
l.a.870	Cl	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
l.a.871	CN	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
l.a.872	F	CN	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
l.a.873	CN	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
l.a.874	F	F	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
l.a.875	Cl	F	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
l.a.876	F	Cl	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
l.a.877	CN	F	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
l.a.878	F	CN	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
l.a.879	F	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
l.a.880	Cl	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
l.a.881	F	Cl	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -

I.a.882	CN	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
I.a.883	F	CN	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
I.a.884	H	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
I.a.885	F	F	Br	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
I.a.886	F	F	C≡CH	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
I.a.887	CF ₃	Cl	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
I.a.888	F	F	I	F	F	Cl	-(CH ₂) ₂ -
I.a.889	F	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
I.a.890	Cl	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
I.a.891	Br	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
I.a.892	CN	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
I.a.893	CH ₃	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
I.a.894	F	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
I.a.895	Cl	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
I.a.896	F	H	H	Cl	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
I.a.897	Cl	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
I.a.898	CN	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
I.a.899	F	H	H	CN	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
I.a.900	CN	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
I.a.901	F	H	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
I.a.902	Cl	H	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
I.a.903	CN	H	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
I.a.904	F	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
I.a.905	Cl	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
I.a.906	F	Cl	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
I.a.907	Cl	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
I.a.908	CN	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -

l.a.909	F	CN	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
l.a.910	CN	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
l.a.911	F	F	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
l.a.912	Cl	F	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
l.a.913	F	Cl	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
l.a.914	CN	F	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
l.a.915	F	CN	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
l.a.916	F	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
l.a.917	Cl	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
l.a.918	F	Cl	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
l.a.919	CN	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
l.a.920	F	CN	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
l.a.921	H	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
l.a.922	F	F	Br	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
l.a.923	F	F	C≡CH	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
l.a.924	CF ₃	Cl	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
l.a.925	F	F	I	F	F	Cl	-(CH ₂) ₃ -
l.a.926	F	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.927	Cl	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.928	Br	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.929	CN	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.930	CH ₃	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.931	F	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.932	Cl	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.933	F	H	H	Cl	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.934	Cl	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.935	CN	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -

l.a.936	F	H	H	CN	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.937	CN	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.938	F	H	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.939	Cl	H	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.940	CN	H	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.941	F	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.942	Cl	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.943	F	Cl	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.944	Cl	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.945	CN	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.946	F	CN	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.947	CN	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.948	F	F	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.949	Cl	F	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.950	F	Cl	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.951	CN	F	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.952	F	CN	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.953	F	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.954	Cl	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.955	F	Cl	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.956	CN	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.957	F	CN	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.958	H	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.959	F	F	Br	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.960	F	F	C≡CH	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.961	CF ₃	Cl	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -
l.a.962	F	F	I	F	F	Cl	-(CH ₂) ₄ -

l.a.963	F	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -
l.a.964	Cl	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -
l.a.965	Br	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -
l.a.966	CN	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -
l.a.967	CH ₃	H	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -
l.a.968	F	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -
l.a.969	Cl	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -
l.a.970	F	H	H	Cl	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -
l.a.971	Cl	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -
l.a.972	CN	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -
l.a.973	F	H	H	CN	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -
l.a.974	CN	H	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -
l.a.975	F	H	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -
l.a.976	Cl	H	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -
l.a.977	CN	H	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -
l.a.978	F	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -
l.a.979	Cl	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -
l.a.980	F	Cl	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -
l.a.981	Cl	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -
l.a.982	CN	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -
l.a.983	F	CN	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -
l.a.984	CN	F	F	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -
l.a.985	F	F	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -
l.a.986	Cl	F	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -
l.a.987	F	Cl	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -
l.a.988	CN	F	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -
l.a.989	F	CN	H	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -

l.a.990	F	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
l.a.991	Cl	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
l.a.992	F	Cl	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
l.a.993	CN	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
l.a.994	F	CN	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
l.a.995	H	F	F	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
l.a.996	F	F	Br	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
l.a.997	F	F	C≡CH	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
l.a.998	CF ₃	Cl	H	H	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
l.a.999	F	F	I	F	F	Cl	-(CH ₂) ₅ -	
l.a.1000	F	H	H	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1001	Cl	H	H	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1002	Br	H	H	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1003	CN	H	H	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1004	CH ₃	H	H	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1005	F	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1006	Cl	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1007	F	H	H	Cl	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1008	Cl	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1009	CN	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1010	F	H	H	CN	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1011	CN	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1012	F	H	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1013	Cl	H	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1014	CN	H	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1015	F	F	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1016	Cl	F	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H

l.a.1017	F	Cl	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1018	Cl	F	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1019	CN	F	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1020	F	CN	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1021	CN	F	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1022	F	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1023	Cl	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1024	F	Cl	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1025	CN	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1026	F	CN	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1027	F	F	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1028	Cl	F	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1029	F	Cl	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1030	CN	F	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1031	F	CN	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1032	H	F	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1033	F	F	Br	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1034	F	F	C≡CH	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1035	CF ₃	Cl	H	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1036	F	F	I	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	H
l.a.1037	F	H	H	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1038	Cl	H	H	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1039	Br	H	H	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1040	CN	H	H	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1041	CH ₃	H	H	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1042	F	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H

l.a.1043	Cl	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1044	F	H	H	Cl	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1045	Cl	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1046	CN	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1047	F	H	H	CN	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1048	CN	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1049	F	H	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1050	Cl	H	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1051	CN	H	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1052	F	F	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1053	Cl	F	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1054	F	Cl	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1055	Cl	F	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1056	CN	F	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1057	F	CN	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1058	CN	F	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1059	F	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1060	Cl	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1061	F	Cl	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1062	CN	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1063	F	CN	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1064	F	F	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1065	Cl	F	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1066	F	Cl	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1067	CN	F	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1068	F	CN	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H

l.a.1069	H	F	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1070	F	F	Br	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1071	F	F	C≡CH	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1072	CF ₃	Cl	H	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1073	F	F	I	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H
l.a.1074	F	H	H	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1075	Cl	H	H	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1076	Br	H	H	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1077	CN	H	H	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1078	CH ₃	H	H	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1079	F	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1080	Cl	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1081	F	H	H	Cl	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1082	Cl	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1083	CN	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1084	F	H	H	CN	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1085	CN	H	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1086	F	H	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1087	Cl	H	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1088	CN	H	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1089	F	F	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1090	Cl	F	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1091	F	Cl	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1092	Cl	F	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1093	CN	F	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1094	F	CN	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃

l.a.1095	CN	F	F	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1096	F	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1097	Cl	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1098	F	Cl	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1099	CN	F	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1100	F	CN	H	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1101	F	F	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1102	Cl	F	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1103	F	Cl	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1104	CN	F	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1105	F	CN	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1106	H	F	F	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1107	F	F	Br	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1108	F	F	C≡CH	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1109	CF ₃	Cl	H	H	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1110	F	F	I	F	F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃
l.a.1111	F	H	H	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
l.a.1112	Cl	H	H	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
l.a.1113	Br	H	H	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
l.a.1114	CN	H	H	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
l.a.1115	CH ₃	H	H	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
l.a.1116	F	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
l.a.1117	Cl	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
l.a.1118	F	H	H	Cl	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
l.a.1119	Cl	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
l.a.1120	CN	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃

I.a.1121	F	H	H	CN	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1122	CN	H	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1123	F	H	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1124	Cl	H	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1125	CN	H	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1126	F	F	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1127	Cl	F	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1128	F	Cl	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1129	Cl	F	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1130	CN	F	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1131	F	CN	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1132	CN	F	F	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1133	F	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1134	Cl	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1135	F	Cl	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1136	CN	F	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1137	F	CN	H	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1138	F	F	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1139	Cl	F	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1140	F	Cl	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1141	CN	F	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1142	F	CN	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1143	H	F	F	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1144	F	F	Br	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1145	F	F	C≡CH	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
I.a.1146	CF ₃	Cl	H	H	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃

l.a.1147	F	F	I	F	F	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
l.a.1148	F	H	H	H	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1149	Cl	H	H	H	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1150	Br	H	H	H	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1151	CN	H	H	H	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1152	CH ₃	H	H	H	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1153	F	H	H	F	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1154	Cl	H	H	F	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1155	F	H	H	Cl	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1156	Cl	H	H	F	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1157	CN	H	H	F	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1158	F	H	H	CN	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1159	CN	H	H	F	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1160	F	H	F	H	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1161	Cl	H	F	H	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1162	CN	H	F	H	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1163	F	F	F	H	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1164	Cl	F	F	H	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1165	F	Cl	F	H	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1166	Cl	F	F	H	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1167	CN	F	F	H	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1168	F	CN	F	H	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1169	CN	F	F	H	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1170	F	F	H	F	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1171	Cl	F	H	F	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1172	F	Cl	H	F	F	Cl	CH ₃	H

l.a.1173	CN	F	H	F	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1174	F	CN	H	F	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1175	F	F	F	F	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1176	Cl	F	F	F	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1177	F	Cl	F	F	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1178	CN	F	F	F	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1179	F	CN	F	F	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1180	H	F	F	F	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1181	F	F	Br	F	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1182	F	F	C≡CH	F	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1183	CF ₃	Cl	H	H	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1184	F	F	I	F	F	Cl	CH ₃	H
l.a.1185	F	H	H	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
l.a.1186	Cl	H	H	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
l.a.1187	Br	H	H	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
l.a.1188	CN	H	H	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
l.a.1189	CH ₃	H	H	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
l.a.1190	F	H	H	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
l.a.1191	Cl	H	H	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
l.a.1192	F	H	H	Cl	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
l.a.1193	Cl	H	H	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
l.a.1194	CN	H	H	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
l.a.1195	F	H	H	CN	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
l.a.1196	CN	H	H	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
l.a.1197	F	H	F	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
l.a.1198	Cl	H	F	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃

I.a.1199	CN	H	F	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1200	F	F	F	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1201	Cl	F	F	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1202	F	Cl	F	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1203	Cl	F	F	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1204	CN	F	F	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1205	F	CN	F	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1206	CN	F	F	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1207	F	F	H	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1208	Cl	F	H	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1209	F	Cl	H	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1210	CN	F	H	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1211	F	CN	H	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1212	F	F	F	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1213	Cl	F	F	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1214	F	Cl	F	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1215	CN	F	F	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1216	F	CN	F	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1217	H	F	F	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1218	F	F	Br	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1219	F	F	C≡CH	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1220	CF ₃	Cl	H	H	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1221	F	F	I	F	F	CH ₂ Cl	Cl	CH ₃
I.a.1222	F	H	H	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1223	Cl	H	H	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1224	Br	H	H	H	F	CN	CH ₃	CH ₃

I.a.1225	CN	H	H	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1226	CH ₃	H	H	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1227	F	H	H	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1228	Cl	H	H	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1229	F	H	H	Cl	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1230	Cl	H	H	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1231	CN	H	H	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1232	F	H	H	CN	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1233	CN	H	H	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1234	F	H	F	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1235	Cl	H	F	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1236	CN	H	F	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1237	F	F	F	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1238	Cl	F	F	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1239	F	Cl	F	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1240	Cl	F	F	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1241	CN	F	F	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1242	F	CN	F	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1243	CN	F	F	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1244	F	F	H	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1245	Cl	F	H	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1246	F	Cl	H	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1247	CN	F	H	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1248	F	CN	H	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1249	F	F	F	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
I.a.1250	Cl	F	F	F	F	CN	CH ₃	CH ₃

l.a.1251	F	Cl	F	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
l.a.1252	CN	F	F	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
l.a.1253	F	CN	F	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
l.a.1254	H	F	F	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
l.a.1255	F	F	Br	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
l.a.1256	F	F	C≡CH	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
l.a.1257	CF ₃	Cl	H	H	F	CN	CH ₃	CH ₃
l.a.1258	F	F	I	F	F	CN	CH ₃	CH ₃
l.a.1259	F	H	H	H	F	OCH ₃	H	H
l.a.1260	Cl	H	H	H	F	OCH ₃	H	H
l.a.1261	Br	H	H	H	F	OCH ₃	H	H
l.a.1262	CN	H	H	H	F	OCH ₃	H	H
l.a.1263	CH ₃	H	H	H	F	OCH ₃	H	H
l.a.1264	F	H	H	F	F	OCH ₃	H	H
l.a.1265	Cl	H	H	F	F	OCH ₃	H	H
l.a.1266	F	H	H	Cl	F	OCH ₃	H	H
l.a.1267	Cl	H	H	F	F	OCH ₃	H	H
l.a.1268	CN	H	H	F	F	OCH ₃	H	H
l.a.1269	F	H	H	CN	F	OCH ₃	H	H
l.a.1270	CN	H	H	F	F	OCH ₃	H	H
l.a.1271	F	H	F	H	F	OCH ₃	H	H
l.a.1272	Cl	H	F	H	F	OCH ₃	H	H
l.a.1273	CN	H	F	H	F	OCH ₃	H	H
l.a.1274	F	F	F	H	F	OCH ₃	H	H
l.a.1275	Cl	F	F	H	F	OCH ₃	H	H
l.a.1276	F	Cl	F	H	F	OCH ₃	H	H

l.a.1277	Cl	F	F	H	F	OCH ₃	H	H
l.a.1278	CN	F	F	H	F	OCH ₃	H	H
l.a.1279	F	CN	F	H	F	OCH ₃	H	H
l.a.1280	CN	F	F	H	F	OCH ₃	H	H
l.a.1281	F	F	H	F	F	OCH ₃	H	H
l.a.1282	Cl	F	H	F	F	OCH ₃	H	H
l.a.1283	F	Cl	H	F	F	OCH ₃	H	H
l.a.1284	CN	F	H	F	F	OCH ₃	H	H
l.a.1285	F	CN	H	F	F	OCH ₃	H	H
l.a.1286	F	F	F	F	F	OCH ₃	H	H
l.a.1287	Cl	F	F	F	F	OCH ₃	H	H
l.a.1288	F	Cl	F	F	F	OCH ₃	H	H
l.a.1289	CN	F	F	F	F	OCH ₃	H	H
l.a.1290	F	CN	F	F	F	OCH ₃	H	H
l.a.1291	H	F	F	F	F	OCH ₃	H	H
l.a.1292	F	F	Br	F	F	OCH ₃	H	H
l.a.1293	F	F	C≡CH	F	F	OCH ₃	H	H
l.a.1294	CF ₃	Cl	H	H	F	OCH ₃	H	H
l.a.1295	F	F	I	F	F	OCH ₃	H	H
l.a.1296	F	H	H	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1297	Cl	H	H	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1298	Br	H	H	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1299	CN	H	H	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1300	CH ₃	H	H	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1301	F	H	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1302	Cl	H	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	H

l.a.1303	F	H	H	Cl	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1304	Cl	H	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1305	CN	H	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1306	F	H	H	CN	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1307	CN	H	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1308	F	H	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1309	Cl	H	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1310	CN	H	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1311	F	F	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1312	Cl	F	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1313	F	Cl	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1314	Cl	F	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1315	CN	F	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1316	F	CN	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1317	CN	F	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1318	F	F	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1319	Cl	F	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1320	F	Cl	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1321	CN	F	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1322	F	CN	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1323	F	F	F	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1324	Cl	F	F	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1325	F	Cl	F	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1326	CN	F	F	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1327	F	CN	F	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1328	H	F	F	F	F	OCH ₃	CH ₃	H

l.a.1329	F	F	Br	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1330	F	F	C≡CH	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1331	CF ₃	Cl	H	H	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1332	F	F	I	F	F	OCH ₃	CH ₃	H
l.a.1333	F	H	H	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1334	Cl	H	H	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1335	Br	H	H	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1336	CN	H	H	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1337	CH ₃	H	H	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1338	F	H	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1339	Cl	H	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1340	F	H	H	Cl	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1341	Cl	H	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1342	CN	H	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1343	F	H	H	CN	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1344	CN	H	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1345	F	H	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1346	Cl	H	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1347	CN	H	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1348	F	F	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1349	Cl	F	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1350	F	Cl	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1351	Cl	F	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1352	CN	F	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1353	F	CN	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1354	CN	F	F	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃

l.a.1355	F	F	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1356	Cl	F	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1357	F	Cl	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1358	CN	F	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1359	F	CN	H	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1360	F	F	F	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1361	Cl	F	F	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1362	F	Cl	F	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1363	CN	F	F	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1364	F	CN	F	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1365	H	F	F	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1366	F	F	Br	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1367	F	F	C≡CH	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1368	CF ₃	Cl	H	H	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1369	F	F	I	F	F	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
l.a.1370	F	H	H	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
l.a.1371	Cl	H	H	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
l.a.1372	Br	H	H	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
l.a.1373	CN	H	H	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
l.a.1374	CH ₃	H	H	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
l.a.1375	F	H	H	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
l.a.1376	Cl	H	H	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
l.a.1377	F	H	H	Cl	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
l.a.1378	Cl	H	H	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
l.a.1379	CN	H	H	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	
l.a.1380	F	H	H	CN	F	H	-O(CH ₂) ₃ -	

l.a.1381	CN	H	H	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -
l.a.1382	F	H	F	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -
l.a.1383	Cl	H	F	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -
l.a.1384	CN	H	F	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -
l.a.1385	F	F	F	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -
l.a.1386	Cl	F	F	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -
l.a.1387	F	Cl	F	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -
l.a.1388	Cl	F	F	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -
l.a.1389	CN	F	F	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -
l.a.1390	F	CN	F	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -
l.a.1391	CN	F	F	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -
l.a.1392	F	F	H	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -
l.a.1393	Cl	F	H	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -
l.a.1394	F	Cl	H	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -
l.a.1395	CN	F	H	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -
l.a.1396	F	CN	H	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -
l.a.1397	F	F	F	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -
l.a.1398	Cl	F	F	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -
l.a.1399	F	Cl	F	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -
l.a.1400	CN	F	F	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -
l.a.1401	F	CN	F	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -
l.a.1402	H	F	F	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -
l.a.1403	F	F	Br	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -
l.a.1404	F	F	C≡CH	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -
l.a.1405	CF ₃	Cl	H	H	F	H	-O(CH ₂) ₃ -
l.a.1406	F	F	I	F	F	H	-O(CH ₂) ₃ -

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

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

- b1) ингибиторы биосинтеза липидов;
- b2) ингибиторы ацетолактат синтазы (ингибиторы ALS);
- b3) ингибиторы фотосинтеза;
- b4) ингибиторы протопорфириноген-IX оксидазы,
- b5) отбеливающие гербициды;
- b6) ингибиторы энолпирувилшикимат 3-фосфат-синтазы (ингибиторы EPSP);
- b7) ингибиторы глутаминсинтетазы;

b8) ингибиторы 7,8-дигидроптероатсинтазы (ингибиторы DHP);
 b9) ингибиторы митоза;
 b10) ингибиторы синтеза очень длинноцепочных жирных кислот (VLCFA ингибиторы);
 b11) ингибиторы биосинтеза целлюлозы;
 b12) разобщающие гербициды;
 b13) ауксиновые гербициды;
 b14) ингибиторы транспорта ауксинов; и
 b15) другие гербициды, выбранные из группы, включающей бромобутид, хлорфлуренол, хлорфлу-
 ренол-метил, цинметилин, кумилурон, далапон, дазомет, дифензокват, дифензокват-метилсульфат, диме-
 типин, DSMA (ДНАМ, динатриевый арсенат метила), димрон, эндотал и его соли, этобензанид, флам-
 проп, флампроп-изопропил, флампроп-метил, флампроп-М-изопропил, флампроп-М-метил, флуренол,
 флуренол-бутил, флурпримидол, фосамин, фосамин-аммоний, инданофан, индазифлам, гидразид малеи-
 новой кислоты, мефлуидид, метам, метиозолин (CAS 403640-27-7) метилазид, метилбромид, метил-
 димрон, метилйодид, MSMA (ММНА), олеиновую кислоту, оксазикломефон, пеларгоновую кислоту,
 пирибутикарб, хинокламин, триазифлам, тридифан и 6-хлор-3-(2-циклопропил-6-метилфенокси)-4-
 пиридазиол (CAS 499223-49-3) и его соли и эфиры;

включая их приемлемые с точки зрения сельского хозяйства соли или производные соединения, та-
 кие как простые и сложные эфиры или амиды.

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

Далее приведены примеры гербицидов В, которые могут использоваться в сочетании с соединени-
 ями формулы (I) в соответствии с настоящим изобретением.

b1) Из группы ингибиторов биосинтеза липидов:

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

4-(4'-Хлоро-4-циклопропил-2'-фторо[1,1'-бифенил]-3-ил)-5-гидроксид-

2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3(6Н)-он (CAS 1312337-72-6); 4-(2',4'-Дихлоро-4-
 циклопропил[1,1'-бифенил]-3-ил)-5-гидрокси-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3(6Н)-
 он (CAS 1312337-45-3); 4-(4'-Хлоро-4-этил-2'-фторо[1,1'-бифенил]-3-ил)-5-
 гидрокси-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3(6Н)-он (CAS 1033757-93-5); 4-(2',4'-
 Дихлоро-4-этил[1,1'-бифенил]-3-ил)-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3,5(4Н,6Н)-
 дион(CAS 1312340-84-3); 5-(Ацетилокси)-4-(4'-хлоро-4-циклопропил-2'-
 фторо[1,1'-бифенил]-3-ил)-3,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3-он (CAS
 1312337-48-6); 5-(Ацетилокси)-4-(2',4'-дихлоро-4-циклопропил- [1,1'-бифенил]-3-
 yl)-3,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3-он; 5-(Ацетилокси)-4-(4'-хлоро-4-
 этил-2'-фторо[1,1'-бифенил]-3-ил)-3,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3-он
 (CAS 1312340-82-1); 5-(Ацетилокси)-4-(2',4'-дихлоро-4-этил[1,1'-бифенил]-3-ил)-
 3,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3-он (CAS 1033760-55-2); 4-(4'-Хлоро-4-
 циклопропил-2'-фторо[1,1'-бифенил]-3-ил)-5,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-5-оксо-
 2Н-пиран-3-ил метилэфир угольной кислоты (CAS 1312337-51-1); 4-(2',4'-
 Дихлоро-4-циклопропил- [1,1'-бифенил]-3-yl)-5,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-5-
 оксо-2Н-пиран-3-ил метилэфир угольной кислоты; 4-(4'-Хлоро-4-этил-2'-
 фторо[1,1'-бифенил]-3-ил)-5,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-5-оксо-2Н-пиран-3-ил
 метилэфир угольной кислоты (CAS 1312340-83-2); 4-(2',4'-Дихлоро-4-этил[1,1'-
 бифенил]-3-ил)-5,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-5-оксо-2Н-пиран-3-ил метилэфир
 угольной кислоты (CAS 1312340-83-2); 4-(2',4'-дихлоро-4-этил[1,1'-бифенил]-3-
 ил)-5,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-5-оксо-2Н-пиран-3-ил метилэфир угольной
 кислоты (CAS 1033760-58-5);

и не-АСС-гербициды, такие как бенфурезат, бутилат, циклоат, далапон, димепиперат, ЕРТС, эспро-
 карб, этофумезат, флупропанат, молинат, орбенкарб, пебулат, просульфокарб, трехосновная карбоновая
 кислота, тиобенкарб, тиокарбазил, триллат и вернолат.

b2) Из группы ингибиторов ALS:

сульфонилмочевины, такие как амидосульфурон, азимсульфурон, бенсульфурон, бенсульфурон-метил, хлоримурон, хлоримурон-этил, хлорсульфурон, циносульфурон, циклосульфамурон, этаметсульфурон, этаметсульфурон-метил, этоксисульфурон, флазасульфурон, флуцетосульфурон, флупирсульфурон, флупирсульфурон-метил-натрий, форамсульфурон, галосульфурон, галосульфурон-метил, имазосульфурон, иодосульфурон, иодосульфурон-метил-натрий, мезосульфурон, метазосульфурон, метсульфурон, метсульфурон-метил, никосульфурон, ортосульфамурон, оксасульфурон, примисульфурон, примисульфурон-метил, пропирисульфурон, просульфурон, пиразосульфурон, пиразосульфурон-этил, римсульфурон, сульфометурон, сульфометурон-метил, сульфосульфурон, тифенсульфурон, тифенсульфурон-метил, триасульфурон, трибенурон, трибенурон-метил, трифлорисульфурон, трифлусульфурон, трифлусульфурон-метил и тритосульфурон, имидазолиноны, такие как имазаметабенз, имазаметабенз-метил, имазамокс, имазапик, имазапир, имазахин и имазетапир, гербициды группы триазолопиримидина и сульфонанилиды, такие как хлорансулам, хлорансулам-метил, диклосулам, флуметсулам, флорасулам, метосулам, пеноксулам, пиримисульфам и пироксулам, пиримидинилбензоаты, такие как биспирибак, биспирибак-натрий, пирибензоксим, пирифталид, пириминобак, пириминобак-метил, пиритиобак, пиритиобак-натрий, 4-[[[2-[(4,6-диметокси-2-пиримидинил)окси]фенил] метил]амино]бензойной кислоты-1-метилэтиловый эфир (CAS 420138-41-6), 4-[[[2-[(4,6-диметокси-2-пиримидинил)окси]фенил]метил]амино]бензойной кислоты пропиловый эфир (CAS 420138-40-5), N-(4-бромфенил)-2-[(4,6-диметокси-2-пиримидинил)окси]бензолметанамин (CAS 420138-01-8), гербициды группы сульфонаминокарбонил-триазолинона, такие как флукарбазон, флукарбазон-натрий, пропоксикарбазон, пропоксикарбазон-натрий, тиенкарбазон и тиенкарбазон-метил; а также триафамон;

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

b3) Из группы ингибиторов фотосинтеза:

амикарбазон, ингибиторы фотосистемы II, например, гербициды группы триазинов, включая хлор-триазин, триазиноны, триазиндионы, метилтиотриазины и пиридазины, такие как аметрин, атразин, хлоридазон, цианазин, десметрин, диметаметрин, гексазинон, метрибузин, прометон, прометрин, пропазин, симазин, симетрин, тербуметон, тербутилазин, тербутрин и триэтазин, арилмочевины, такие как хлорбромурон, хлортолурун, хлорксурон, димефурон, диурон, флуометурон, изопротурон, изоурон, линурон, метамитрон, метабензтиазурон, метобензурон, метоксурон, монолинурун, небурон, сидурон, тебутиурон и тиadiaзурун, фенилкарбаматы, такие как десмедифам, карбутилат, фенмедифам, фенмедифам-этил, нитриловые гербициды, такие как бромфеноксим, бромоксинил и его соли и сложные эфиры, иоксинил и его соли и сложные эфиры, урацилы, такие как бромацил, ленацил и тербацил, и бентазон и бентазон-натрий, пиридат, пиридафол, пентанохлор и пропанил и ингибиторы фотосистемы I такие как дикват, дикват-дибромид, паракват, паракват-дихлорид и паракват-диметилсульфат.

В том числе предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к таким композициям, содержащим по меньшей мере один гербицид, производное арилмочевины. В том числе таким же образом предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к таким композициям, содержащим по меньшей мере один гербицид группы триазинов. В том числе таким же образом предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к таким композициям, содержащим по меньшей мере один гербицид группы нитрилов.

b4) Из группы ингибиторов протопорфириноген-IX оксидазы:

ацифторфен, ацифторфен-натрий, азафенидин, бенкарбазон, бензфендизон, бифенокс, бутафенацил, карфентразон, карфентразон-этил, хлометоксифен, цинидон-этил, флуазолат, флуфенпир, флуфенпир-этил, флумиклорак, флумиклорак-пентил, флумиоксазин, фторгликофен, фторгликофен-этил, флутиацет, флутиацет-метил, фомесафен, галосафен, лактофен, оксадиаргил, оксадиазон, оксифторфен, пентоксазон, профлуазол, пираклонил, пирафлуфен, пирафлуфен-этил, сафлуфенацил, сульфентразон, тидиазимин, тиафенацил,

этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)фенокс]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6; S-3100), N-этил-3-(2,6-дихлор-4-трифторметилфенокс)-5-метил-1*H*-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452098-92-9), N-тетрагидрофурфурил-3-(2,6-дихлор-4-трифторметилфенокс)-5-метил-1*H*-пиразол-1-карбоксамид (CAS 915396-43-9), N-этил-3-(2-хлор-6-фтор-4-трифторметилфенокс)-5-метил-1*H*-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452099-05-7), N-тетрагидрофурфурил-3-(2-хлор-6-фтор-4-трифторметилфенокс)-5-метил-1*H*-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452100 03 7), 3-[7-фтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2*H*-бензо[1,4]оксазин-6-ил]-1,5-диметил-6-тиоксо-[1,3,5]триазиан-2,4-дион, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифторо-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2*H*-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), 2-(2,2,7-Трифторо-3-оксо-4-проп-2-инил-3,4-дигидро--2*H*-бензо[1,4]оксазин-6-yl)-4,5,6,7-тетрагидро-изоиндол-1,3-дион, 1-Метил-6-трифторометил-3-(2,2,7-трифторо-3-оксо-4-проп-2-инил-3,4-дигидро--2*H*-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-1*H*-пиримидин-2,4-дион, метил(*E*)-4-[2-хлоро-5-[4-хлоро-5-(дифторометокси)-1*H*-метил-пиразол-3-ил]-4-фторо-фенокс]-3-метокси-бут-2-эонат [CAS 948893-00-3] и 3-[7-Хлоро-5-фторо-2-(трифторометил)-1*H*-бензимидазол-4-ил]-1-метил-6-(трифторометил)-1*H*-пиримидин-2,4-дион (CAS 212754-02-4);

b5) Из группы отбеливающих гербицидов:

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

b6) Из группы ингибиторов EPSP синтазы:

глифосат, глифосат-изопропиламмоний, глифосат-калий и глифосат-тримесиум (сульфосат).

b7) Из группы ингибиторов глутамин-синтазы:

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

b8) Из группы ингибиторов DHP синтазы:

асулам.

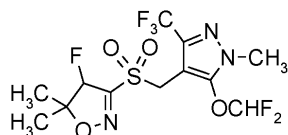
b9) Из группы ингибиторов митоза:

соединения группы K1: динитроанилины, такие как бенфлуралин, бутралин, динитрамин, эталфлуралин, флухлоралин, оризалин, пендиметалин, продиамин и трифлуралин, фосфорамидаты, такие как ампрофос, ампрофос-метил и бутаифос, гербициды, производные бензойной кислоты, такие как хлортал, хлортал-диметил, пиридины, такие как дитиопир и тиазопир, бензамиды, такие как пропизамид и тебутам;

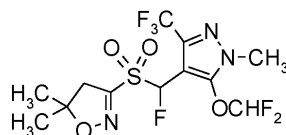
соединения группы K2: хлорпрофам, профам и карбетамида, в том числе, соединения группы K1, в частности, динитроанилины являются предпочтительными.

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

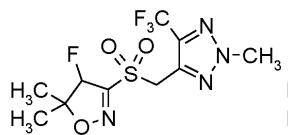
хлорацетамиды, такие как ацетохлор, алахлор, бутахлор, диметахлор, диметенамид, диметенамид-Р, метазахлор, метолахлор, метолахлор-S, пентоксамид, претилахлор, пропахлор, пропизохлор и тенихлор, оксиацетанилиды, такие как флуфенацет и мефенацет, ацетанилиды, такие как дифенамид, напроанилид, напроамид и напроамид-М, тетразолины, такие как фентразамид и другие гербициды, такие как анилофос, кафенстрол, феноксасульфен, ипфенкарбазон, пиперофос, пироксасульфен соединения формул II.1, II.2, II.3, II.4, II.5, II.6, II.7, II.8 и II.9



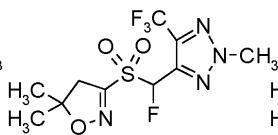
II.1



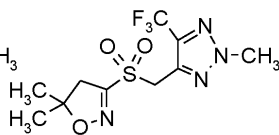
II.2



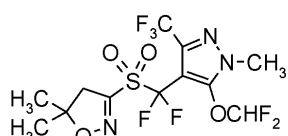
II.3



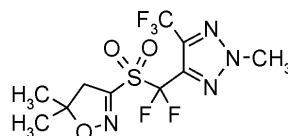
II.4



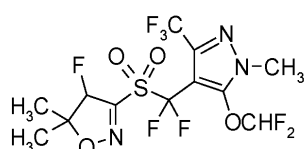
II.5



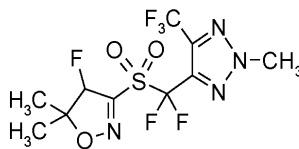
II.6



II.7



II.8



II.9

соединения изоксазолина формулы (I) известны специалистам, например, из документов WO 2006/024820, WO 2006/037945, WO 2007/071900 и WO 2007/096576; среди VLCFA ингибиторов, особенное предпочтение отдается хлорацетидам и оксиацетидам.

b11) Из группы ингибиторов биосинтеза целлюлозы:

хлортиамид, дихлобелин, флупоксам, изоксабен и 1-Циклогексил-5-пентафторфенилокси-1⁴-[1,2,4,6]тиатриазин-3-иламин.

b12) Из группы разобщающих гербицидов:

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

b13) Из группы ауксиновых гербицидов:

2,4-D и его соли и сложные эфиры, такие как клацифос, 2,4-DB и его соли и сложные эфиры, аминоциклопирахлор и его соли и сложные эфиры, аминопиралид и его соли, такие как аминопиралид диметиламмоний, аминопиралид-трис(2-гидроксипропил)аммоний и его сложные эфиры, беназолин, беназолин-этил, хлорамбен и его соли и сложные эфиры, кломеппроп, клопиралид и его соли и сложные эфиры, дикамба и его соли и сложные эфиры, дихлорпроп и его соли и сложные эфиры, дихлорпроп-Р и его соли и сложные эфиры, флуороксибир, флуороксибир-бутометил, флуороксибир-метил, галаукифен и его соли и сложные эфиры (CAS 943832-60-8);

МСПА (2-метил-4-хлорфеноксиуксусная кислота) и ее соли и сложные эфиры, МСПА-тиозтил, МСПВ (2-метил-4-хлорфеноксиизобутановая кислота) и ее соли и сложные эфиры, мекопрок и его соли и сложные эфиры, мекопрок-Р и его соли и сложные эфиры, пиклорам и его соли и сложные эфиры, квинклолак, квинмерак, трибутиламин (ТБА) (2,3,6) и его соли и сложные эфиры, триклопир и его соли и сложные эфиры.

b14) Из группы ингибиторов транспорта ауксинов:

дифлуфензопир, дифлуфензопир-натрий, напалам и напалам-натрий.

b15) Из группы других гербицидов:

бромобутид, хлорфлуренол, хлорфлуренол-метил, цинметилин, кумилурон, циклопириморат (CAS 499223-49-3) и его соли и сложные эфиры далапон, дазомет, дифензокват, дифензокват-метилсульфат, диметипин, DSMA (ДНАМ, двунатриевый арсенат метила), димрон, эндотал и его соли, этобензанид, флампроп, флампроп-изопропил, флампроп-метил, флампроп-М-изопропил, флампроп-М-метил, флуренол, флуренол-бутил, флупримидол, фосамин, фосамин-аммоний, инданофан, индазифлам, гидразид малеиновой кислоты, мефлуидид, метам, метиозолин (CAS 403640-27-7) метилазид, метилбромид, метил-димрон, метилиодид, MSMA (ММНА), олеиновую кислоту, оксакзикломефон, пеларгоновую

кислоту, пирибутикарб, хинокламин, триазифлам, тридифан.

Активные соединения типа В и С, в составе которых имеется карбоксильная группа, могут применяться в виде кислоты, в виде подходящей с точки зрения сельского хозяйства соли, как указано выше, или в виде приемлемого с точки зрения сельского хозяйства производного соединения в композициях по изобретению.

В случае с веществом дикамба, подходящие соли включают те, в которых противоион является приемлемым с точки зрения сельского хозяйства катионом. Например, подходящими солями дикамба являются дикамба-натрий, дикамба-калий, дикамба-метиламмоний, дикамба-диметиламмоний, дикамба-изопропиламмоний, дикамба-дигликольамин, дикамба-оламин, дикамба-диоламин, дикамба-троламин, дикамба-N,N-бис-(3-аминопропил)метиламин и дикамба-диэтилентриамин. Примеры подходящих сложных эфиров включают дикамба-метил и дикамба-бутотил.

Среди подходящих солей 2,4-D следующие: 2,4-D-аммоний, 2,4-D-диметиламмоний, 2,4-D-диэтиламмоний, 2,4-D-диэтанолламмоний (2,4-D-диоламин), 2,4-D-третанолламмоний, 2,4-D-изопропиламмоний, 2,4-D-триизопропиламмоний, 2,4-D-гептиламмоний, 2,4-D-додециламмоний, 2,4-D-тетрадециламмоний, 2,4-D-триэтиламмоний, 2,4-D-трис(2-гидроксипропил)аммоний, 2,4-D-трис(изопропил)аммоний, 2,4-D-троламин, 2,4-D-литий, 2,4-D-натрий. Среди примеров подходящих сложных эфиров 2,4-D следующие: 2,4-D-бутотил, 2,4-D-2-бутоксипропил, 2,4-D-3-бутоксипропил, 2,4-D-бутил, 2,4-D-этил, 2,4-D-этилгексил, 2,4-D-изобутил, 2,4-D-изооктил, 2,4-D-изопропил, 2,4-D-ментил, 2,4-D-метил, 2,4-D-октил, 2,4-D-пентил, 2,4-D-пропил, 2,4-D-тефурил и слацифос.

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

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

Подходящие соли и сложные эфиры МХФУ включают МХФУ-бутотил, МХФУ-бутил, МХФУ-диметил, МХФУ-диоламин, МХФУ-этил, МХФУ-тиоэтил, МХФУ-2-этилгексил, МХФУ-изобутил, МХФУ-изоктил, МХФУ-изопропил, МХФУ-изопротил, МХФУ-метил, МХФУ-оламин, МХФУ-калий, МХФУ-натрий и МХФУ-троламин.

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

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

Примерами подходящего сложного эфира флуроксипира являются флуроксипир-ментил и флуроксипир-2-бутоксипропил-1-метилэтил, при этом предпочтение отдается флуроксипир-ментилу.

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

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

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

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

Подходящие соли глифосата включают, например, глифосат-аммоний, глифосат-диаммоний, глифосат-диметиламмоний, глифосат-изопропиламмоний, глифосат-калий, глифосат-натрий, глифосат-тримезиум, а также соли этаноламина и диэтанолламина, предпочтительно глифосат-диаммоний, глифосат-изопропиламмоний и глифосат-тримезиум (сульфосат).

Подходящей солью глюфосината является, например, глюфосинат-аммоний.

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

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

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

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

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

Подходящей солью дифлуфензопира является, например, дифлуфензопир-натрий.

Подходящей солью напталама является, например, напталам-натрий.

Подходящие соли и сложные эфиры аминоклопирахлора включают, например, аминоклопирахлор-диметиламмоний, аминоклопирахлор-метил, аминоклопирахлор-триизопропаноламмоний, аминоклопирахлор-натрий и аминоклопирахлор-калий.

Подходящей солью хинклорака является, например, хинклорак-диметил аммоний.

Подходящей солью хинмерака является, например, хинмерак-диметил аммоний.

Подходящей солью имазамокса является, например, имазамокс-аммоний. Подходящими солями имазапика являются, например, имазапик-аммоний и имазапик-изопропиламмоний.

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

Подходящей солью имазакина является, например, имазакин-аммоний.

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

Подходящей солью топрамозона является, например, топрамозон-натрий.

Особенно предпочтительными гербицидными соединениями В являются гербициды В в соответствии с определением выше; в частности, гербициды В.1-В.189, перечень которых приведен ниже в табл. В.

Таблица В

	Гербицид В
В.1	клетодим
В.2	клодинафоп-пропаргил
В.3	циклоксидим
В.4	цихалофоп-бутил
В.5	феноксапроп-этил
В.6	феноксапроп-Р-этил
В.7	метамифоп
В.8	пиноксаден
В.9	профоксидим
В.10	сетоксидим
В.11	тепралоксидим
В.12	тралкоксидим
В.13	эспрокарб
В.14	этофумезат
В.15	молинат
В.16	просульфокарб
В.17	тиобенкарб
В.18	триаллат
В.19	бенсульфурон-метил
В.20	биспирибак-натрий
В.21	хлорансулам-метил
В.22	хлорсульфурон
В.23	хлоримурон
В.24	циклосульфамурон
В.25	диклосулам
В.26	флорасулам
В.27	флуметсулам
В.28	флупирсульфурон-метил-натрий
В.29	форамсульфурон
В.30	имазамокс
В.31	имазамокс-аммоний
В.32	имазапик
В.33	имазапик-аммоний
В.34	имазапик-изопропиламмоний

В.35	имазапир
В.36	имазапир-аммоний
В.37	имазапир-изопропиламмоний
В.38	имазаквин
В.39	имазаквин-аммоний
В.40	имазетапир
В.41	имазапир-аммоний
В.42	имазапир-изопропиламмоний
В.43	имазосульфурон
В.44	йодосульфурон-метил-натрий
В.45	иофеносульфурон
В.46	иофеносульфурон-натрий
В.47	мезосульфурон-метил
В.48	метазосульфурон
В.49	метосульфурон-метил
В.50	метосулам
В.51	никосульфурон
В.52	пеносулам
В.53	пропоксикарбазон-натрий
В.54	пиразосульфурон-этил
В.55	пирибензоксим
В.56	пирифталид
В.57	пироксулам
В.58	пропириосульфурон
В.59	римосульфурон
В.60	сульфосульфурон
В.61	тиенкарбазон-метил
В.62	тифеносульфурон-метил
В.63	трибенурон-метил
В.64	тригосульфурон
В.65	триафамон
В.66	аметрин

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

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

В.115	глифосат-диметиламмоний
В.116	глифосат-изопропиламмоний
В.117	глифосат-тримезиум (сульфосат)
В.118	глифосат-калий
В.119	глюфосинат
В.120	глюфосинат-аммоний
В.121	глюфосинат-Р
В.122	глюфосинат-Р-аммоний
В.123	пендиметалин
В.124	трифлуралин
В.125	ацетохлор
В.126	бутахлор
В.127	кафенстрол
В.128	диметенамид-Р
В.129	фентразамид
В.130	флуфенацет
В.131	мефенацет
В.132	метазахлор
В.133	метолахлор
В.134	S-метолахлор
В.135	претилахлор
В.136	феноксасульффон
В.137	изоксабен
В.138	ипфенкарбазон
В.139	пироксасульффон
В.140	2,4-D
В.141	2,4-D-изобутил
В.142	2,4-D-диметиламмоний
В.143	2,4-D-N,N,N- триметиленоаммоний
В.144	аминопиралид

В.145	аминопиралид-метил
В.146	аминопиралид-диметиламмоний
В.147	аминопиралид-трис(2-гидроксипропил)аммоний
В.148	клопиралид
В.149	клопиралид-метил
В.150	клопиралид-оламин
В.151	дикамба
В.152	дикамба-бутотил
В.153	дикамба-дигликоамин
В.154	дикамба-диметиламмоний
В.155	дикамба-диоламин
В.156	дикамба-изопропиламмоний
В.157	дикамба-калий
В.158	дикамба-натрий
В.159	дикамба-троламин
В.160	дикамба-N,N-бис-(3-аминопропил)метиламин
В.161	дикамба-диэтиленetriамин
В.162	флуороксипир
В.163	флорксипир-метил
В.164	МХФУ
В.165	МХФУ-2-этилгексил
В.166	МХФУ-диметиламмоний
В.167	хинклорак
В.168	хинклорак-диметиламмоний
В.169	хинмерак
В.170	хинмерак-диметиламмоний
В.171	аминоциклопирахлор
В.172	аминоциклопирахлор-калий
В.173	аминоциклопирахлор-метил

В.174	дифлуфензопир
В.175	дифлуфензопир-натрий
В.176	димрон
В.177	инданофан
В.178	индазифлам
В.179	оксазикломефон
В.180	триазилам
В.181	II.1
В.182	II.2
В.183	II.3
В.184	II.4
В.185	II.5
В.186	II.6
В.187	II.7
В.188	II.8
В.189	II.9

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

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

Примерами предпочтительных антидотов С являются беноксакор, клоквинтоцет, циометринил, ципросульфамид, дихлормид, дициклонон, диэтолат, фенхлоразол, фенклорим, флуразол, флуоксофенил, фуриазол, изоксадифен, мефенпир, мефенат, нафтольный ангидрид, оксабетринил, 4-(дихлорацетил)-1-окса-4-азаспиро[4.5]декан (MON4660, CAS 71526-07-3), 2,2,5-триметил-3-(дихлорацетил)-1,3-оксазолидин

(R-29148, CAS 52836-31-4) и N-(2-метоксибензоил)-4-[(метиламинокарбонил)амино]бензолсульфонамид (CAS 129531-12-0).

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

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

Активные соединения В групп b1)-b15) и соединения-антидоты С являются известными гербицидами и антидотами, см., например, The Compendium of Pesticide Common Names (<http://www.alanwood.net/pesticides/>); Farm Chemicals Handbook, 2000, том 86, Meister Publishing Company, 2000; B. Hock, C. Fedtke, R.R. Schmidt, Herbicide [Herbicides], Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1995; W.H. Ahrens, Herbicide Handbook, 7-е издание, Weed Science Society of America, 1994; и K.K. Hatzios, Herbicide Handbook, приложение к 7-му изданию, Weed Science Society of America, 1998. 2,2,5-триметил-3-(дихлорацетил)-1,3-оксазолидин [CAS-номер 52836-31-4] также известен как R-29148. 4-(дихлорацетил)-1-окса-4-азаспиро[4.5]декан [CAS-номер 71526-07-3] также известен как AD-67 и MON 4660.

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

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

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу определения гербицида с использованием мутированной TrtA, кодированной нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или ее вариант или производное.

Данный способ включает следующие этапы:

- получение трансгенной клетки или растения с нуклеиновой кислотой, кодирующей мутированную TrtA, где мутированная TrtA экспрессирована;
- нанесение гербицида на трансгенную клетку или растение пункта а) и на контрольную клетку или растение того же вида;
- определение роста или жизнеспособности трансгенной и контрольной клетки или растения после применения указанного гербицида; и
- отбор "гербицидов", которые привели к уменьшению роста контрольной клетки или растения по сравнению с ростом трансгенной клетки или растения.

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

В способах борьбы с сорняками после появления всходов, которые могут применяться в различных

вариантах осуществления изобретения, используются дозы внесения $>0,3\times$ гербицидов; в некоторых вариантах осуществления такие дозировки могут составлять, например, приблизительно $>0,3\times$, $>0,4\times$, $>0,5\times$, $>0,6\times$, $>0,7\times$, $>0,8\times$, $>0,9\times$ или $>1\times$ гербицидов. В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения устойчивые к гербицидам растения по настоящему изобретению обладают устойчивостью при внесении гербицидов после появления всходов в количествах приблизительно 25-200 г а. и./га. В некоторых вариантах осуществления, когда растением устойчивым к гербицидам является двудольное растение (например, соя, хлопок), гербициды вносятся после появления всходов в количествах приблизительно 50 г а. и./га. В других вариантах осуществления, когда растением устойчивым к гербицидам является однодольное растение (например, кукуруза, рис, сорго), гербициды вносятся после появления всходов в количествах приблизительно 200 г а. и./га. В других вариантах осуществления, когда растением устойчивым к гербицидам является Brassica (например, канولا), гербициды вносятся после появления всходов в количествах приблизительно 25 г а. и./га. При использовании способов борьбы с сорняками после появления всходов по настоящему изобретению, в некоторых вариантах осуществления дозировки гербицидов могут применяться приблизительно через 7-10 дней после появления всходов. В соответствии с другим вариантом осуществления доза внесения гербицидов может превышать $1\times$; в некоторых вариантах осуществления доза внесения гербицидов может составлять $4\times$, тем не менее, как правило, доза внесения будет составлять приблизительно $2,5\times$ или менее или приблизительно $2\times$ или менее или приблизительно $1\times$ или менее гербицидов.

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

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

Получив растения с повышенной устойчивостью к гербициду можно использовать большое разнообразие соединений для защиты растений от сорняков, чтобы таким образом улучшить рост растений и уменьшить борьбу за питательные вещества. Гербицид может использоваться для контроля над сорняками до всхода, после всхода, до посева и во время выращивания сельскохозяйственных культур, описанных в настоящем документе, в районах их произрастания, или могут использоваться препараты, содержащие гербицид и другие добавки. Гербициды могут также использоваться для обработки семян. Добавки в гербицидах включают другие гербициды, детергенты, адъюванты, лиофилизирующие агенты, склеивающие агенты, стабилизирующие агенты и другие, подобные вещества. Препаративные формы гербицида могут представлять собой влажные или сухие препараты и включать, помимо прочего, сыпучие порошки, концентраты эмульсии и жидкие концентраты. Гербицид и гербицидные препараты можно применять в соответствии со стандартными методами, например, путем обрызгивания, орошения, опрыскивания или другими подобными методами.

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

Как описано в настоящем документе, нуклеиновые кислоты TrtA по настоящему изобретению могут использоваться в повышении устойчивости к гербицидам растений, включающих в своих геномах ген, кодирующий белок TrtA дикого типа или белок с мутированной TrtA, устойчивый к гербицидам. Этот ген может быть эндогенным или трансгенным в соответствии с описанием выше. Также в некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению можно сгруппировать с помощью любой комбинации интересующих полинуклеотидных последовательностей для создания растений с необходимым фенотипом. Например, нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению можно сгруппировать с помощью любых других полинуклеотидов, кодирующих полипептиды с пестицидной и/или инсектицидной активностью, таких, как, например, токсинные белки *Bacillus thuringiensis* (описано в патенты США № 5366892; 5747450; 5737514; 5723756; 5593881; и Geiser et al. (1986), Gene, 48:109), 5-энолпирувилликимат-3-фосфат синтаза (EPSPS), глифосат ацетилтрансфераза (GAT), цитохром P450 монооксигеназа, фосфинотрицин ацетилтрансфераза (PAT), ANAS (ANAS; EC 4.1.3.18, также известна как ацетолактатсинтаза или ALS), гидроксифенилпируват диоксигеназа (HPPD), фитоендесатураза (PD), протопорфириноген оксидаза (PPO) и дикамба-разрушающие ферменты в соответствии с описанием в WO 02/068607 или ферменты, разрушающие производные феноксиуксусной и феноксипропионовой кислоты в соответствии с описанием в WO 2008141154 или WO 2005107437. Полученные комбинации могут также включать множественные копии любого из интересующих полинуклеотидов.

Следовательно, гербицидостойкие растения по настоящему изобретению могут использоваться в сочетании с гербицидом, к которому они устойчивы. Растения по настоящему изобретению могут обрабатываться гербицидами с помощью любых известных специалистам способов. Гербициды могут при-

меняться на любом этапе выращивания растений. Например, гербициды могут применяться на предпосадочном, посадочном, предвсходовом, послевсходовом этапе или на нескольких из них. Гербициды могут наноситься на семена и высушиваться для образования слоя на семенах.

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

Способы борьбы с сорняками или нежелательной растительностью.

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

В соответствии с некоторыми аспектами изобретения настоящим изобретением предоставляется способ борьбы с сорняками в месте произрастания растений, при этом указанный способ включает: внесение гербицидной композиции, содержащей гербициды, в место произрастания растений; при этом на указанном месте

(a) произрастает растение или посажено семя, способное развиваться в указанное растение; или

(b) будет произрастать растение или будет посажено такое семя после внесения указанной гербицидной композиции; при этом указанные растение или семя, по меньшей мере, в некоторых своих клетках содержат полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функционирующим в клетках растений, при этом промотор способен экспрессировать полипептид TgIA дикого типа или мутированной TgIA, кодированный указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида TgIA дикого типа или мутированной TgIA придает указанному растению устойчивость к гербицидам.

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

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

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

В соответствии с другими аспектами гербицид(ы) (например, гербициды) могут также использоваться для обработки семян. В некоторых вариантах осуществления эффективная концентрация или эффективное количество гербицида или гербицидов или композиция, содержащая гербицид или гербициды в эффективной концентрации или эффективное количество гербицида или гербицидов могут наноситься непосредственно на семена перед посевом или в ходе посева семян. Препаративные формы для обработки семян могут дополнительно содержать связующие вещества и, в некоторых случаях, красители.

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

пигмент 36, зеленый пигмент 7, белый пигмент 6, коричневый пигмент 25, базовый фиолетовый 10, базовый фиолетовый 49, кислотный красный 51, кислотный красный 52, кислотный красный 14, кислотный синий 9, кислотный желтый 23, базовый красный 10, базовый красный 108.

Термин "обработка семян" включает все соответствующие известные специалистам методы обработки семян, такие, например, как протравливание семян, нанесение покрытия на семена, опудривание семян, намачивание семян и гранулирование семян. В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения настоящим изобретением предоставляется способ обработки почвы путем внесения, в частности, в борозду для семян: гранулированного препарата, содержащего гербициды в качестве композиции/препарата (например, гранулированного препарата), в некоторых случаях, вместе с одним или несколькими твердыми или жидкими приемлемыми с точки зрения сельского хозяйства носителями и/или, в некоторых случаях, вместе с одним или несколькими приемлемыми с точки зрения сельского хозяйства поверхностно-активными веществами. Этот способ преимущественно используется для обработки почвы, подготовленной для посева, например, зерновых культур, маиса, хлопка и подсолнечника.

Настоящее изобретение также включает семена, покрытые препаратами для обработки семян содержащие такие препараты, которые содержат гербициды и по меньшей мере еще один гербицид, такой как ингибитор АНАС, выбранный из группы, включающей амидосульфурон, азимосульфурон, беносульфурон, хлоримулон, хлоросульфурон, циноосульфурон, циклосульфамурон, этаметосульфурон, этоксисульфурон, флазасульфурон, флуцетосульфурон, флупирисульфурон, форамосульфурон, галосульфурон, имазосульфурон, йодосульфурон, мезосульфурон, метосульфурон, никосульфурон, оксасульфурон, примисульфурон, просульфурон, пиразосульфурон, римосульфурон, сульфометурон, сульфосульфурон, тифеносульфурон, триасульфурон, трибенурон, трифлорисульфурон, трифлосульфурон, тритосульфурон, имазаметабенз, имазамокс, имзапик, имзапир, имзаквин, имзетапир, хлорасулам, диклосулам, флорасулам, флуметсулам, метосулам, пеноксулам, биспирибак, пириминобак, пропоксикарбазон, флукарбазон, пирибензоксим, пирифталид и пиритиобак.

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

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

В соответствии с другими вариантами осуществления изобретения при обработке семян соответствующие препараты применяются путем обработки семян эффективным количеством гербицидов или препаратом, содержащим гербициды.

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

Термин "сорняки" в соответствии с настоящим изобретением включает, например, двудольные и однодольные сорняки. Двудольные сорняки включают, помимо прочего, сорняки следующих родов:

Sinapis (горчица), Lepidium (клоповник), Galium (подмаренник), Stellaria (звездчатка), Matricaria (ромашка), Anthemis (пупавка), Galinsoga (галинсога), Chenopodium (марь), Urtica (крапива), Senecio (крестовник), Amaranthus (щирица), Portulaca (портулак), Xanthium (дурнишник), Convolvulus (вьюнок), Ipomoea (ипомея), Polygonum (горец), Sesbania (сесбания), Ambrosia (амброзия), Cirsium (бодяк), Carduus (чертополох), Sonchus (осот), Solanum (паслен), Rotippra (жерушник), Rotala (ротала), Lindernia (линдерния), Lamium (яснотка), Veronica (вероника), Abutilon (канатник), Emex (эмекс), Datura (дурман), Viola (виола), Galeopsis (пикульник), Papaver (мак), Centaurea (василек), Trifolium (клевер), Ranunculus (ранункулос) и Taraxacum (одуванчик). Однодольные сорняки включают, помимо прочего, сорняки следующих родов: Echinochloa (ежовник), Setaria (щетинник), Panicum (просо), Digitaria (росичка), Phleum (timoфеевка), Poa (мятлик), Festuca (овсяница), Eleusine (элеусина), Brachiaria (брахиария), Lolium (плевел), Bromus (костер), Avena (овес), Cyperus (циперус), Sorghum (сорго), Agropyron (пырей), Cynodon (свиной), Monochoria (монокория), Fimbristylis (фимбристис), Sagittaria (сагиттария), Eleocharis (элеохарис), Scirpus (камыш), Paspalum (паспалум), Ischaemum (исхаемум), Sphenoclea (сфенокля), Dactyloctenium (дактилоктениум), Agrostis (полевица), Alopecurus (лисохвост) и Apera (метлица).

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

В соответствии с другими вариантами осуществления изобретения при обработке семян соответствующие препараты применяются путем обработки семян эффективным количеством гербицидов или препаратом, содержащим гербициды.

В соответствии с другими аспектами обработка мест произрастания, растений, частей растений или семян по настоящему изобретению включает применение приемлемой с точки зрения сельского хозяйства композиции, не содержащей А.1. В соответствии с одним вариантом осуществления изобретения такая обработка включает применение приемлемой с точки зрения сельского хозяйства композиции, не содержащей гербицидов в качестве А.1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения такая обработка включает применение приемлемой с точки зрения сельского хозяйства композиции, не содержащей гербицидов в качестве А.1., причем указанная композиция содержит один или несколько приемлемых с точки зрения сельского хозяйства носителей, разбавителей, вспомогательных веществ, регуляторов роста и других подобных веществ. В соответствии с другими вариантами осуществления изобретения обработка включает применение приемлемой с точки зрения сельского хозяйства композиции, не содержащей гербицидов в качестве А.1., причем указанная композиция содержит вспомогательное вещество. В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения указанным вспомогательным веществом является ПАВ, вещество, способствующее распределению А.1., адгезивный агент, пропитывающее вещество, агент для борьбы с уносом вещества, маслянистый концентрат, эмульгатор, агент, обеспечивающий совместимость, или комбинации указанных веществ.

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

Примеры

Пример 1. Бактериальные штаммы.

Химически компетентные образцы *Escherichia coli* TOP10 (Life Technologies; США) и BL21(DE3) Gold (Agilent Technologies; Германия) использовались в качестве реципиентов при экспериментах по трансформации. Трансформация выполнялась в соответствии с описанием в Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982). *Agrobacterium tumefaciens* использовалась для введения области Т-ДНК в *Arabidopsis*, кукурузу и сою.

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

Пример 2. Синтез генов, расщепление рестрикционными энзимами и клонирование.

Синтез генов и необходимое клонирование в вектор pMK-RQ выполнялись компанией Eurofins (Германия). Рестрикционные энзимы приобретали в Новой Зеландии. Их использовали в соответствии с инструкциями производителя.

Пример 3. Очистка белков.

TriA и ее варианты получали в E.coli BL21(DE3) Gold (Agilent Technologies, Германия). Следовательно, E.coli трансформировали с использованием соответствующего вектора экспрессии метки pET24d N-HIS и шапероновой плазмиды pGro7 (шапероны groEL и groES). Бактериальные штаммы выращивали при температуре 30°C в 100 мл LB в течение 20 ч, а экспрессию белка индуцировали с использованием 0,1 ммоль IPTG при 25°C в течение 20 ч. Сбор клеток производился с помощью центрифугирования на скорости 3000 об/мин в течение 20 мин при температуре 4°C, после чего они были повторно помещены в реактив для извлечения белка "Бэг Бастер" в соответствии с инструкцией производителя. Лизаты очищали центрифугированием. Образцы бычьего сывороточного альбумина (5, 10 и 20 г) выгружали на каждый из исследуемых гелей с использованием денситометрии для определения внутреннего стандарта. Найденные параметры белков проверяли с использованием красителя белкового анализа в соответствии с инструкцией производителя (Thermo Scientific; США). Энзимы с меткой HIS очистили металл-аффинной хроматографией с использованием набора Ni-IDA 1000 (Macherey-Nagel, Германия) согласно инструкциям производителя. Чистота белков оценивалась при помощи SDS-PAGE с использованием готового заводского геля NuPAGE Novex 4-12% (Life Technologies; CIF), окрашенного с применением Coomassie Brilliant Blue (Serva, Германия). Концентрации белка оценивались посредством измерения коэффициента поглощения на 280 нм с использованием Lambda Bio+ (Perkin Elmer, США).

Пример 4. Кинетика энзимов.

Суспензию клеток в состоянии покоя, содержащую ген TriA, инкубировали в различных азинах, меламинах и атразине, а фильтрат культуры анализировали масс-спектрометрией СВЭЖХ высокого разрешения. Субстраты получали из Sigma-Aldrich или синтезировали самостоятельно. Синтетические стандарты и продукты реакции энзимов анализировали масс-спектрометрией СВЭЖХ высокого разрешения (Thermo/Dionex UPLC UltiMate3000 в сочетании с масс-спектрометром QExactive высокого разрешения). Использовали колонку Waters Acquity HSS T3 (2,1; 100 мм; 1,8 мкмоль) с мобильной фазой вода/ацетонитрил (0,1% раствор муравьиной кислоты) со скоростью потока 0,6 мкл мин⁻¹. Использовали энзимы, растворенные в 25 ммоль буфера фосфата натрия (pH 7.2) с концентрацией субстрата в диапазоне от 1 до 10 мкмоль при 30°C. Со временем первоначальный пик азинов исчез, тогда как количество образовавшегося ОН-метаболита (продукт реакции) увеличилось. Продукт был обнаружен посредством определения точной формулы и анализа точных фрагментов МС-МС. Более того, некоторые из образовавшихся продуктов по стандарту оригинала совместно элюировали. Степень разложения рассчитывали по клеткам, которые содержали пустой вектор в качестве контрольной группы.

Пример 5. Направленная эволюция аминоксидролазы.

Азины поместили в активную область модели TriA (на основании структуры кристалла trzN), разместив молекулы поверх меламина. Так были найдены радикалы, которые формируют активную область и связывающий карман для субстратов. Основные регионы, отвечающие за координацию иона металла в активной области; радикалы, которые по имеющимся сведениям имеют важное значение для активности амидогидролазы; радикалы, которые формируют гидрофобное "основание" активной области или имеют важное значение для активности гидролазы при взаимодействиях с ароматическим кольцом субстрата, изменениям подвергнуты не были. Однако при этом для расширения набора энзимов были модифицированы аминоксидролазы. Эта модель использовалась, с одной стороны, для предсказания аминоксидролных мишеней из-за пределов активной области, которые могут в целом повлиять на способность к принятию триазинов, а с другой стороны, модель применялась для нахождения аминоксидрол, которые занимают пространство в кармане энзимов, и которые можно заменить на меньшие по размеру аминоксидролы с аналогичной гидрофобностью, чтобы обеспечить наличие места для большего количества крупных азинов без изменения активности энзима.

Пример 6. Создание модельных растений с гербицидной устойчивостью.

Конструирование растений Arabidopsis устойчивых к гербицидам класса азинов с последовательностями амидогидролазы дикого типа или мутированной амидогидролазы. При трансформации Arabidopsis thaliana, последовательности амидогидролазы дикого типа или мутированной амидогидролазы на основе одной SEQ ID NO: 1, кодирующей SEQ ID NO: 2, клонируют с использованием стандартных техник кло-

нирования, как описано у Sambrook et al. (Molecular cloning (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press) в бинарный вектор, содержащий кассету маркерного гена устойчивости (AHAS) и мутировавшую последовательность амидогидролазы (маркированную как GOI) между убиквитиновым промотором (PcUbi) и терминаторной последовательностью нопалин синтазы (NOS). Для трансформации растения бинарные плазмиды интродуцируют в *Agrobacterium tumefaciens*. *Arabidopsis thaliana* трансформируют последовательностями мутированной амидогидролазы или дикого типа способом "цветочного погружения", как описано McElver and Singh (WO 2008/124495). Трансгенные растения *Arabidopsis* были подвергнуты анализу TaqMan для определения количества локусов интеграции.

Пример 7. Проверка модельных растений с гербицидной устойчивостью.

Для подбора растений *Arabidopsis thaliana*, стойких к азинам, используется экспрессирование TriA и ее вариантов. Проводили анализ выбранных линий *Arabidopsis thaliana* на наличие улучшенной устойчивости к азинам, таким как 6-циклопентил-N4-(2,3,4,5,6-пентафторфенил)-1,3,5-триазин-2,4-диамин в 48-луночных планшетах. Таким образом, семена T2 простерилизованы на поверхности путем перемешивания на протяжении 5 мин в растворе этанол - вода (70+30 по объему), однократно промыты раствором этанол - вода (70+30 по объему) и дважды стерилизованной деионизированной водой. Семена повторно помещены в 0,1% агар, растворенный в воде (мас./об.). От четырех до пяти семян помещены в твердую питательную среду, состоящую из полуконцентрированного питательного раствора Мурасиге-Скуга, pH 5,8 (Murashige and Skoog (1962), Physiologia 40 Plantarum, 15:473-497). Соединения растворены в диметилсульфоксиде (ДМСО) и добавлены к среде до момента затвердевания (конечная концентрация ДМСО 0,1%). Инкубирование на многолуночных планшетах осуществляют в камере роста при температуре 22°C, относительной влажности 75% и 110 $\mu\text{моль Phot}\times\text{м}^{-2}\times\text{с}^{-1}$ при 14:10-часовой фотопериод темнота/свет. Задержку роста оценивают через семь - десять дней после посева по сравнению с растениями дикого типа. Факторы устойчивости рассчитывают на основании значений IC₅₀ для подавления роста трансформированных растений *Arabidopsis* по сравнению с нетрансформированными. В дополнение трансгенные растения T2 или T3 *Arabidopsis* тестируют на повышенную устойчивость к гербицидам-ингибиторам биосинтеза целлюлозы в ходе исследований в теплице.

Пример 8. Создание и испытание культур с гербицидной устойчивостью.

Бинарные векторы были получены в соответствии с описанием в примере 9. Соя сорта Jake была трансформирована в соответствии с описанием в Siminszky et al., Phytochem Rev., 5:445-458 (2006). После регенерации трансформанты пересаживались в почву в маленьких горшочках, с помещением в камеры роста (16 ч. день/8 ч. ночь; 25°C днем/ 23°C ночью; 65% относительной влажности; 130-150 $\text{мЕ м}^{-2}\text{с}^{-1}$) и далее тестировались на присутствие Т-ДНК с помощью анализа Taqman. Спустя несколько недель, здоровые, трансгенные положительные, с единичной копией линии трансплантируют в более крупные горшки и выращивают в камере роста. Оптимальная длина побега для среза составляет порядка 3-4 дюймов, где должны присутствовать по меньшей мере два узла. Каждый отросток берут от исходного трансформанта (материнское растение) и погружают в порошок с гормоном, способствующим появлению корней (индол-3-масляная кислота, ИМК). Затем отросток помещают в среду Oasis Wedges внутри купола. Материнское растение развивалось до зрелости и использовалось для получения семян. Также одновременно брались отростки дикого типа, которые служили для целей негативного контроля. Отростки хранят в биокуполе 5-7 дней. Через 7-10 дней после переноса в среду Oasis Wedges, корни обрабатывают гербицидом с помощью питательного раствора. Через 3-4 дня после обработки производят оценку типичных фитотоксических симптомов, таких как булавовидный корень. Трансгенные растения с меньшей степенью повреждения или без повреждений по сравнению с растениями дикого типа считаются растениями, обладающими устойчивостью к гербицидам.

Незрелые зародыши кукурузы трансформировали в соответствии с процедурой, описанной в работе Peng et al. (WO2006/136596). Растения тестировали на наличие Т-ДНК путем проведения анализа Taqman, при котором целью являлся pos-терминатор, присутствующий во всех конструктах. Растения без признаков поражения были отправлены в теплицу для закаливания и испытания обрызгиванием. Растения были по-отдельности пересажены в почву MetroMix 360 в 4-дюймовые горшки. После помещения в теплицу (цикл день/ночь при 27/21°C, продолжительность дня 14 ч, которая обеспечивалась за счет использования 600 Вт натриевых ламп высокого давления) они прорастали на протяжении 14 дней. Трансгенные растения кукурузы культивировались для получения семян T1 семена для тестирования устойчивости к гербицидам. Через 7-10 дней после переноса корни обрабатывают гербицидом с помощью питательного раствора. Через 3-4 дня после обработки производят оценку типичных фитотоксических симптомов, таких как булавовидный корень. Трансгенные растения с меньшей степенью повреждения или без повреждений по сравнению с растениями дикого типа считаются растениями, обладающими устойчивостью к гербицидам. Для обработки после всхода растений тестовые растения сначала выращивают до высоты 3-15 см в зависимости от характера растения и только затем обрабатывают гербицидами. Для этой цели тестовые растения либо засеивают непосредственно в контейнеры и там же их выращивают, либо сначала их выращивают отдельно и трансплантируют в тестовые контейнеры за несколько дней до обработки. Оценка нанесения вреда гербицидами проводится спустя 2 и 3 недели после обработки. Нанесение вреда растению оценивается по шкале от 0 до 100%, где 0 означает отсутствие вреда, а 100% - полное

уничтожение. Результаты представлены в следующих табл. 2, 3 и 4 и на фиг. 3 и 4.

Таблица 2

Аминокислоты, участвующие в обмене	Повреждение корня [%]
N70N	80
N70A	0
L92V	50
Q96M	н.о.
D128I	0
M155V	10
F157	50
N70LQ71I	н.о.
N70SQ71L	н.о.
L88AL92A	0
Q71I_L92V_M155V_F157I	н.о.

Таблица 3

Нуклеиновые кислоты, участвующие в обмене	Линия	Фактор толерантности
N70A	13359	++
N70A	13684	++
N70A	13713	++
N70A	13901	++
N70A	13920	++
N70A	13932	++
N70A	13996	-

N70A	13998	++
N70A	14038	++
N70A	14041	++
N70A	14086	++
N70A	14103	-
L92V	13988	++
L92V	14720	++
L92V	13791	++
L92V	13802	++
L92V	13982	+
L92V	13571	+
L92V	13821	+
L92V	13627	-
Q96M	14765	++
Q96M	14411	++
Q96M	13947	++
Q96M	14406	++
Q96M	14402	++
Q96M	14408	+
Q96M	14403	-
D128I	13737	+
D128I	13768	++
D128I	13779	++
D128I	13808	+
D128I	13994	++
D128I	14001	++
D128I	14049	++
M155V	13552	-
M155V	13745	++
M155V	14029	++
M155V	14033	++
M155V	14080	++
M155V	14478	++

M155V	14826	++
N70LQ71I	14096	+++
N70LQ71I	13710	++
N70LQ71I	13906	++
N70LQ71I	13824	++
N70LQ71I	14208	++
N70LQ71I	14181	++
N70LQ71I	14177	++
N70LQ71I	13398	+++
N70LQ71I	14153	++
N70LQ71I	14028	++
N70LQ71I	13396	-
N70LQ71I	14755	+++
N70SQ71L	13798	+++
N70SQ71L	13733	+++
N70SQ71L	14000	++
N70SQ71L	14108	++
N70SQ71L	14045	++
N70SQ71L	13716	++
N70SQ71L	13763	++
N70SQ71L	13577	++
L88AL92A	13636	++
L88AL92A	13807	++
L88AL92A	14149	++
L88AL92A	14645	++
L88AL92A	14760	+
L88AL92A	13634	-
превосходная	6-8	+++
очень хорошая - хорошая	2-6	++
небольшая	1-2	+
устойчивость отсутствует	0	-

Таблица 4

Аминокислоты, участвующие в обмене	Promoter	Линия	Фактор толерантности
D128I	p-pcUBI	13737	+
D128I	p-pcUBI	13768	++
D128I	p-pcUBI	13779	++
D128I	p-pcUBI	13808	+
D128I	p-pcUBI	13994	++
D128I	p-pcUBI	14001	++
D128I	p-pcUBI	14049	++
D128I	p-ET11820a	14657	+++
D128I	p-ET11820a	14651	+++
D128I	p-ET11820a	14757	++
D128I	p-ET11820a	14656	++
D128I	p-ET11820a	14659	++
D128I	p-ET11820a	14649	++
D128I	p-ET11820a	14631	++
D128I	p-Glyma04g34080	14630	++
D128I	p-Glyma04g34080	14640	++
D128I	p-Glyma04g34080	14653	++
D128I	p-Glyma04g34080	14655	++
D128I	p-Glyma04g34080	14673	++
D128I	p-Glyma04g34080	14713	+++
D128I	p-Glyma04g34080	14717	++
D128I	p-Glyma04g34080	14719	++
D128I	p-Glyma04g34080	14725	++
D128I	p-Glyma04g34080	14650	++
M155V	p-pcUBI	13552	-
M155V	p-pcUBI	13745	++
M155V	p-pcUBI	14029	++
M155V	p-pcUBI	14033	++

M155V	p-pcUBI	14080	++
M155V	p-pcUBI	14478	++
M155V	p-pcUBI	14826	++
M155V	p-ET11820a	14628	-
M155V	p-ET11820a	14641	++
M155V	p-ET11820a	14648	++
M155V	p-ET11820a	14652	++
M155V	p-ET11820a	14663	+
M155V	p-ET11820a	14664	+
M155V	p-ET11820a	14674	-
M155V	p-ET11820a	14723	+
M155V	p-ET11820a	14750	++
M155V	p-Glyma04g34080	14646	++
M155V	p-Glyma04g34080	14654	++
M155V	p-Glyma04g34080	14716	++
M155V	p-Glyma04g34080	14729	+++
M155V	p-Glyma04g34080	14772	++

Обозначения к значениям из табл. 13 аналогичным образом применяются и к табл. 4.

Пример 9. Поостроение бинарного вектора.

Способы клонирования, например, использование рестрикционной эндонуклеазы для вырезания двухцепочечной ДНК в заданных областях, электрофореза в агарозном геле, очистки фрагментов ДНК, перенос нуклеиновых кислот на никтоцеллюлозные и нейлоновые мембраны, соединение фрагментов ДНК, трансформация клеток *E.coli* и культур бактерий выполнялись в соответствии с описанием в Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87965-309-6). Реакция цепочки полимеразы проводилась с использованием высокоточной полимеразы ДНК Phusion™ (NEB, Франкфурт, Германия) в соответствии с инструкциями производителя. В целом праймеры, которые использовались в PCR, были сконструированы так, что по меньшей мере 20 нуклеотидов 3-го конца праймера идеально ренатурируют с шаблоном для расширения. Добавлены сайты рестрикции для прикрепления соответствующих нуклеотидов сайтов узнавания к 5-му концу праймера. Полимерная цепная реакция синтеза, например, как описано в K. Heckman and L.R. Pease, *Nature Protocols* (2207), 2, 924-932, использовалась в качестве альтернативного способа соединения двух целевых фрагментов, например, промотора к гену или гена к терминатору. Синтез генов, как, например, описано в Czar и др. (*Trends in Biotechnology*, 2009, 27(2):63-72), выполнялся компанией Life Technologies с использованием их сервиса Genearth®.

Гены оценивали на предмет использования кодонов и присутствия сайтов рестрикции, которые могут помешать при проведении клонирования. При необходимости кодоны в генах были оптимизированы с использованием стандартных протоколов для максимальной экспрессии в культурном растении (например, см. Puigbo et al., 2007; и Gasper et al., 2012), а также для удаления нежелательных сайтов рестрикции. Гены были синтезированы компанией GeneArt (Регенсбург) или усилены цепной реакцией синтеза с использованием высокоточной полимеразы ДНК Phusion™ (NEB, Франкфурт, Германия) в соответствии с инструкциями производителя из кДНК. В обоих случаях вводились сайты рестрикции NcoI и/или AscI на 5-м конце, а также сайт рестрикции PacI на 3-м конце, что обеспечивало клонирование данных генов между функциональными элементами, такими как промоторы и терминаторы, с использованием данных сайтов рестрикции. Модули промотор-терминатор или модули промотор-интрон-терминатор были созданы посредством полного синтеза компанией GeneArt (Регенсбург) или соединением соответствующих элементов экспрессии с использованием ПЦР синтеза и клонирования продукта ПЦР в ТОРО-вектор pCR2.1 (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Во время присоединения последовательностей терминаторов к последовательностям промоторов или промотор-интронным последовательностям посредством синтеза всей кассеты или с использованием ПЦР синтеза в любую из сторон модуля добавлялись распознающие последовательности рестрикционной эндонуклеазы, сайты узнавания рестрикционной эндонуклеазы NcoI, AscI и PacI вводились между промотором и терминатором или между интроном и терминатором. Для получения конечных модулей экспрессии усиленные реакцией ПЦР гены клонировались между промотором и терминатором или между интроном и терминатором через сайты рестрикции NcoI и/или PacI.

В качестве альтернативы синтез генов, как, например, описано в Czar и др. (*Trends in Biotechnology*, 2009, 27(2):63-72), может выполняться компанией Life Technologies с использованием их сервиса Genearth®. Стандартные способы, такие как клонирование, рестрикция, молекулярный анализ, трансформа-

ция клеток *E.coli* и бактериальных культур, могут быть реализованы в соответствии с описанием в Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87965-309-6). Реакция цепочки полимеразы может проводиться с использованием высокоточной полимеразы ДНК Phusion™ (NEB, Франкфурт, Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Полимерная цепная реакция синтеза может выполняться, как описано в K. Heckman, L.R. Pease, *Nature Protocols* (2207), 2, 924-932. В обоих случаях могут вводиться сайты рестрикции NcoI и/или AscI на 5-м конце, а также сайт рестрикции PacI на 3-м конце, что обеспечивало клонирование данных генов между функциональными элементами. Модули промотор-терминатор или модули промотор-интрон-терминатор были созданы посредством полного синтеза компанией GeneArt (Регенсбург) или соединением соответствующих элементов экспрессии с использованием ПНР синтеза и клонирования продукта ПЦР в ТОРО-вектор pCR2.1 (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Во время присоединения последовательностей терминаторов к последовательностям промоторов или промотор-интронным последовательностям посредством синтеза всей кассеты или с использованием ПЦР синтеза в любую из сторон модуля могут добавляться распознающие последовательности рестрикционной эндонуклеазы, сайты узнавания рестрикционной эндонуклеазы NcoI, AscI и PacI могут вводиться между промотором и терминатором или между интроном и терминатором. Для получения конечных модулей экспрессии усиленные реакцией ПЦР гены могут клонироваться между промотором и терминатором или между интроном и терминатором через сайты рестрикции NcoI и/или PacI. Кодоны в целевых генах могут быть оптимизированы с использованием стандартных протоколов для максимальной экспрессии в культурном растении (например, см. Puigbo et al., 2007; и Gasper et al., 2012), а также для удаления нежелательных сайтов рестрикции, при этом они могут быть синтезированы компанией GeneArt (Регенсбург, Германия).

Список используемой литературы

- Esser HO, Dupuis G, Ebert E, Marco GJ, Vogel C (1975) s-Triazines. In: Kearney PC, Kaufman DJ (eds) *Herbicides, chemistry, degradation and mode of action*. Marcel Dekker, New York, стр. 129–208
- Seffernick JL, McTavish H, Osborne JP, de Souza ML, Sadowsky MJ, Wackett LP (2002) Atrazine chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp. strain ADP is a metalloenzyme. *Biochemistry* 41: 14430–14437
- Wackett et al.; Biodegradation of atrazine and related s-triazine compounds: from enzymes to field studies, *Applied Microbiology and Biotechnology*; 58 (1), 39–45, 2002
- de Souza ML, Sadowsky MJ, Wackett LP (1996) Atrazine chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp strain ADP: Gene sequence, enzyme purification, and protein characterization. *Journal of Bacteriology* 178: 4894–4900.
- Sadowsky et al.; US 6369299, Transgenic plants expressing bacterial atrazine degrading gene AtzA
- Padgett S. R. et al., Site directed mutagenesis of a conserved region of the 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase active-site.; *J.Biol. Chem.*, 266, 33, 1991
- Maniatis *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1982)
- Gasper P., Oliveira J-L., Frommlet J., Santos M.A.S., Moura G. (2012) EuGene: maximizing synthetic gene design for heterologous expression. (2011) *Bioinformatics* 27: 2683-2684).
- Murashige and Skoog 1962 *Physiologia* 40 Plantarum 15: (Molecular cloning (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Komori T., Imayama T., Kato N., Ishida Y., Ueiki J., Komari T. (2007) Current Status of Binary Vectors and Sub-binary Vectors. *Plant Physiology* 145, 1155-1160.
- Puigbo P., Guzman E., Romeu A., Garcia-Valve A. (2007) OPTIMIZER: A Web Server for Optimizing the Codon Usage of DNA Sequences. (1982) *Nucleic Acids Research* 35 (9): 2997–3011). W126-W131.
- Siminszky B., Plant cytochrome P450-mediated herbicide metabolism, *Phytochem Rev.* 5:445-458, 2006

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Растение или часть растения, содержащие полинуклеотид, кодирующий мутированный полипептид TrtA, имеющий по всей длине варианта по меньшей мере 80, 90, 95, 98, 99% или более идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 2,

причем аминокислотная последовательность отличается от аминокислотной последовательности дикого типа в одной или более позициях, соответствующих позициям 70, 71, 88, 91, 92, 96, 126, 128, 155, 157 последовательности SEQ ID NO: 2,

причем экспрессия указанного полинуклеотида придает растению или части растения устойчивость к гербицидам,

причем полинуклеотид, кодирующий мутированный полипептид TrtA, содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1,

причем кодированный мутированный полипептид TrtA обладает активностью меламинадиаменазы, и причем гербицид содержит соединение, являющееся ингибитором биосинтеза целлюлозы.

2. Семя, способное развиться в растение, содержащее, по меньшей мере, в некоторых своих клетках полинуклеотид, как определено в п.1, функционально связанный с промотором, способным функционировать в клетках растений,

при этом промотор способен экспрессировать мутированный полипептид TrtA, кодированный ука-

занным полинуклеотидом,

при этом экспрессия мутированного полипептида TgIA придает указанному растению устойчивость к гербицидам, содержащим соединение, являющееся ингибитором биосинтеза целлюлозы,

причем полинуклеотид, кодирующий мутированный полипептид TgIA, содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, и

причем кодируемый мутированный полипептид TgIA обладает активностью меламинадиаменазы.

3. Клетка растения, содержащая полинуклеотид, как определено в п.1, функционально связанный с промотором, способным функционировать в клетке,

при этом промотор способен экспрессировать мутированный полипептид TgIA, кодируемый указанным полинуклеотидом,

при этом экспрессия мутированного полипептида TgIA придает указанному растению устойчивость к гербицидам, содержащим соединение, являющееся ингибитором биосинтеза целлюлозы,

причем полинуклеотид, кодирующий мутированный полипептид TgIA, содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, и

причем кодируемый мутированный полипептид TgIA обладает активностью меламинадиаменазы.

4. Потомство или потомки растения, содержащие, по меньшей мере, в некоторых своих клетках полинуклеотид, как определено в п.1, функционально связанный с промотором, способным функционировать в клетках растений,

при этом промотор способен экспрессировать мутированный полипептид TgIA, кодируемый указанным полинуклеотидом,

причем указанное потомство или потомки растения, по меньшей мере, в некоторых своих клетках содержат полинуклеотид, функционально связанный с промотором,

при этом экспрессия мутированного полипептида TgIA придает указанному потомству или потомку растения устойчивость к гербицидам, содержащим соединение, являющееся ингибитором биосинтеза целлюлозы,

причем полинуклеотид, кодирующий мутированный полипептид TgIA, содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, и

причем кодируемый мутированный полипептид TgIA обладает активностью меламинадиаменазы.

5. Способ улучшения роста растений посредством борьбы с сорняками в месте произрастания растений, при этом указанный способ включает

(а) внесение гербицидной композиции, содержащей гербициды, содержащие соединение, являющееся ингибитором биосинтеза целлюлозы, в место произрастания растений; и

(b) посев семян, как определено в п.2, в месте произрастания растений.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что гербицидную композицию наносят на сорняки и растение, разбившееся из указанного семени.

7. Способ получения растения с устойчивостью к гербицидам, содержащим соединение, являющееся ингибитором биосинтеза целлюлозы, при этом указанный способ включает регенерирование растения из клетки растения, трансформированной рекомбинантным полинуклеотидом, как определено в п.1, функционально связанным с промотором, способным функционировать в клетке, при этом промотор способен экспрессировать мутированный полипептид TgIA, кодируемый указанным полинуклеотидом, при этом экспрессия мутированного полипептида TgIA придает указанному растению устойчивость к указанным гербицидам,

причем полинуклеотид, кодирующий мутированный полипептид TgIA, содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, и

причем кодируемый мутированный полипептид TgIA обладает активностью меламинадиаменазы.

8. Изолированная, и/или полученная рекомбинантным путем, и/или синтетическая молекула нуклеиновой кислоты, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую мутированный полипептид TgIA, обладающий активностью меламинадиаменазы, выбранной из группы, состоящей из

(а) молекулы нуклеиновой кислоты с идентичностью 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5% или более с последовательностью молекулы нуклеиновой кислоты полинуклеотида, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, придающей повышенную устойчивость или стойкость к гербицидам, содержащим соединение, являющееся ингибитором биосинтеза целлюлозы, по сравнению с соответствующими клеткой растения, растением или его частью дикого типа;

(b) молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей мутированный полипептид TgIA, с идентичностью 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5% или более с аминокислотной последовательностью полипептида TgIA последовательности SEQ ID NO: 2, и придающей повышенную устойчивость или стойкость к гербицидам, содержащим соединение, являющееся ингибитором биосинтеза целлюлозы, по сравнению с соответствующими клеткой растения, растением или его частью дикого типа;

(с) молекулы нуклеиновой кислоты, которая гибридизирует с молекулой нуклеиновой кислоты по пунктам (а) или (б) в жестких условиях гибридизации и придает повышенную устойчивость или стойкость к гербицидам, содержащим соединение, являющееся ингибитором биосинтеза целлюлозы, по сравнению с соответствующими клеткой растения, растением или его частью дикого типа,

причем аминокислотная последовательность мутированного полипептида TtiA отличается от аминокислотной последовательности полипептида TtiA дикого типа в одной или более позициях, соответствующих следующим позициям последовательности SEQ ID NO: 2: 70, 71, 88, 91, 92, 96, 126, 128, 155, 157.

9. Молекула нуклеиновой кислоты по п.8, причем соответствующие клетка растения дикого типа, растение или его часть по (а), (б) и/или (с) являются нетрансформированными.

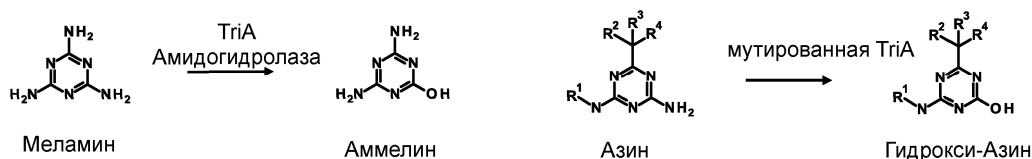
10. Кассета экспрессии, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п.8 или 9, а также промотор, функционирующий в клетках растений.

11. Кассета экспрессии по п.10, отличающаяся тем, что промотор является корнеспецифичным промотором.

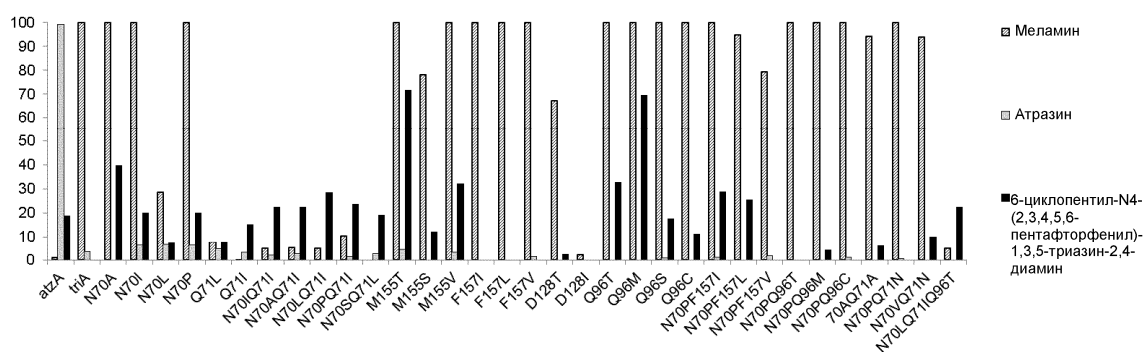
12. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.8 или 9 или кассету экспрессии по п.10 или 11.

13. Изолированный, рекомбинантный и/или химически синтезированный мутированный полипептид TtiA, обладающий активностью меламинамидазы, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты по п.8 или 9, или полипептид, обладающий по меньшей мере на 80, 90, 95, 98, 99% идентичностью с последовательностью SEQ ID NO: 2, причем аминокислотная последовательность мутированного полипептида TtiA отличается от аминокислотной последовательности полипептида TtiA дикого типа в одной или более позициях, соответствующих следующим позициям последовательности SEQ ID NO: 2: 70, 71, 88, 91, 92, 96, 126, 128, 155, 157, и придает повышенную устойчивость или стойкость к гербицидам, содержащим соединение, являющееся ингибитором биосинтеза целлюлозы, по сравнению с соответствующими клеткой растения, растением или его частью дикого типа.

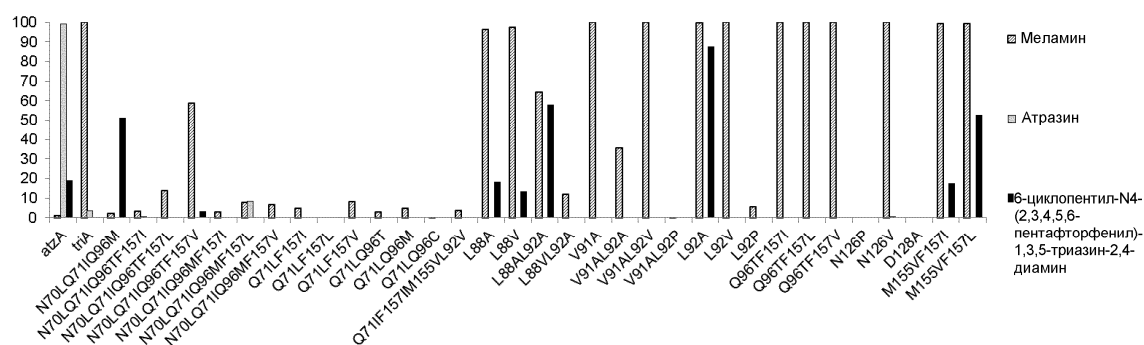
14. Мутированный полипептид TtiA по п.13, причем соответствующие клетка растения дикого типа, растение или его часть являются нетрансформированными.



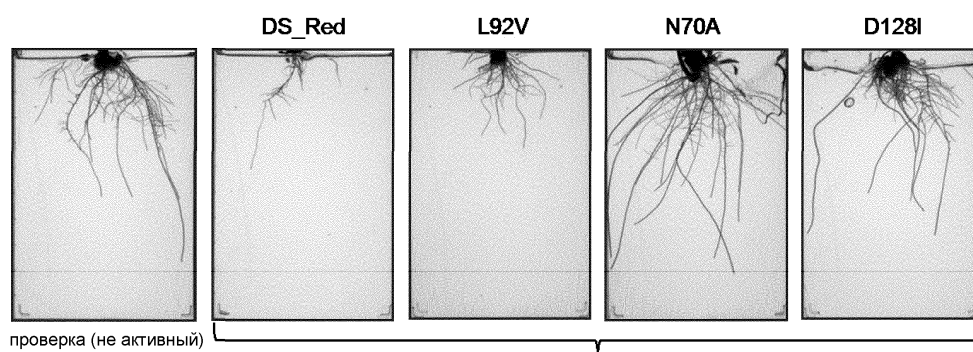
Фиг. 1



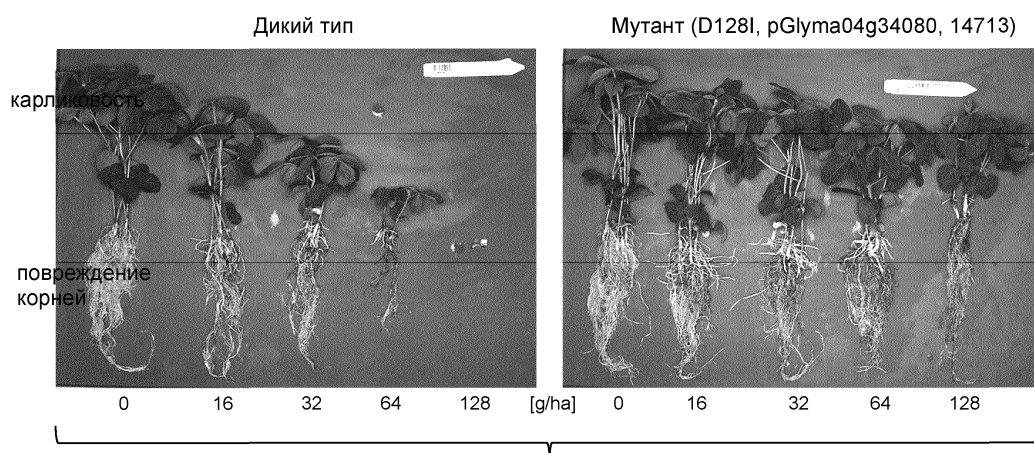
Фиг. 2А



Фиг. 2В



Фиг. 3



Фиг. 4

