

**УКРАЇНА****(19) UA (11) 119532 (13) C2****(51) МПК (2019.01)****C12N 9/02 (2006.01)****C12N 15/82 (2006.01)****C12N 5/10 (2006.01)****A01H 5/00****A01H 5/10 (2018.01)**

**МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ**

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2015 03416	(72) Винахідник(и): Поре Фабієн (DE), Хайнріхс Фолькер (DE), Ланге Гудрун (DE), Лабер Бернд (DE), Пітерс Шеріл (US), Шоутен Лаура (US)
(22) Дата подання заявки: 13.09.2013	(73) Власник(и): БАЙЄР КРОПСАЙЄНС ЛП, 2 T.W. Alexander Drive, Research Triangle Park, NC 27709, United States of America (US), БАЙЄР КРОПСАЙЄНС АГ, Alfred-Nobel-Strasse 50, 40789 Monheim, Germany (DE)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.07.2019	(74) Представник: Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/701,037, 61/766,057, 61/790,404	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: EP 2453012 A1, 16.05.2012 WO 2009144079 A1, 03.12.2009 WO 2011053557 A1, 05.05.2011
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 14.09.2012, 18.02.2013, 15.03.2013	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US, US, US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.08.2015, Бюл.№ 15	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.07.2019, Бюл.№ 13	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ PCT/US2013/059598, 13.09.2013	

(54) ВАРІАНТ НРРД ТА СПОСІБ ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ**(57) Реферат:**

Винахід стосується ферменту 4-гідроксифенілпіруват деоксигенази (НРРД), а саме рекомбінантної молекули нуклеїнової кислоти, яка кодує НРРД, де вказана молекула нуклеїнової кислоти кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1 і v^f амінокислотні заміщення в положеннях 335, 336, 339 та 340, де вказаний НРРД фермент є толерантним до гербіциду - НРРД інгібітора.

UA 119532 C2

Перехресне посилання на споріднені заявки

Дана заявка заявляє пріоритет за попередніми заявками США, реєстраційні № 61/701,037, поданою 14 вересня 2012 року; реєстраційні № 61/766,057, поданою 18 лютого 2013 року та реєстраційні № 61/790,404, поданою 15 березня 2013 року, зміст яких включено у даний документ за допомогою посилання у всій їх повноті.

Перелік послідовностей

Дана офіційна копія переліку послідовностей була представлена електронно через систему подачі документів EFS-Web. Доданий файл у форматі ASCII, який має назву "2912939_19973WO01_SEQLIST.txt", і який був створений 12 вересня 2013 і має об'єм 237 кБ, було подано одночасно із описом. Перелік послідовностей, який міститься у доданому документі формату ASCII є частиною опису і його наведено у даному документі за допомогою посилання у всій його повноті.

Галузь винаходу

Винахід стосується молекулярної біології рослин, зокрема, нових HPPD поліпептидів, які надають підвищеної стійкості до гербіцидів - інгібіторів HPPD.

Суть винаходу

4-гідроксифенілпіруват діоксигенази (HPPD) являють собою ферменти, що каталізують реакцію, в якій пара-гідроксифенілпіруват (скорочено тут як HPP), продукт деградації тирозину, трансформується в гомогентизат (скорочено тут як HG), прекурсор токоферолу та пластохінону у рослинах (Crouch N.P. et al. (1997), Tetrahedron, 53, 20, 6993-7010, Fritze et al. (2004), Plant Physiology 134:1388-1400). Токоферол діє як мембрано-асоційований антиоксидант. Пластохінон, спочатку діє як носій електронів між PSII та цитохромним b6/f комплексом, а, по-друге, являє собою окисно-відновний кофактор для фітоїндесатурази, яка бере участь в біосинтезі каротиноїдів.

До цього часу понад 1000 послідовностей нуклеїнової кислоти з різних організмів, представлені в базі даних NCBI, були анотовані як кодуєчі для передбачуваного білка, що має HPPD домен. Але для більшості з них не було доведено, що білок матиме HPPD ферментативну активність, ні при дослідженні *in vitro*, ні при дослідженні *in planta*, ні що такий HPPD білок надає стійкості до гербіцидів - інгібіторів HPPD, коли експресується в рослині. Декілька HPPD білків та їхні первинні послідовності були описані в найсучасніших публікаціях, зокрема HPPD білки бактерій, таких як *Pseudomonas* (Rüetschi et al., Eur. J. Biochem., 205, 459-466, 1992, WO 96/38567), *Kordia* (WO2011076889), *Synechococcus* (WO2011076877), та *Rhodococcus* (WO2011076892), найпростіших, таких як *Blepharisma* (WO2011076882), *Euryarchaeota*, таких як *Picrophilus* (WO2011076885), рослин, таких як *Arabidopsis* (WO 96/38567, GENBANK® AF047834), морква (WO 96/38567, GENBANK® 87257), *Avena sativa* (WO 02/046387, WO 11/068567), пшениця (WO 02/046387), *Brachiaria platyphylla* (WO 02/046387), *Cenchrus echinatus* (WO 02/046387), *Lolium rigidum* (WO 02/046387), *Festuca arundinacea* (WO 02/046387), *Setaria faberi* (WO 02/046387), *Eleusine indica* (WO 02/046387), *Sorghum* (WO 02/046387, WO 12/021785), кукурудза (WO 12/021785), *Coccicoides* (GENBANK® COITRP), *Coptis japonica* (WO 06/132270), *Chlamydomonas reinhardtii* (ES 2275365) / WO2011/145015, чи ссавців, таких як миша або свиня.

Інгібування HPPD приводить до "розімкненості" фотосинтезу, недостатності спряжених додаткових світлозбиральних пігментів, і, найважливіше, до деструкції хлорофілу УФ-опроміненням та активними сполуками кисню (втрата кольору (знебарвлення)) через втрату фотопротекції, яку зазвичай забезпечують каротиноїди (Norris et al. (1995), Plant Cell 7: 2139-2149). Втрата кольору (знебарвлення) фотосинтетичних тканин призводить до уповільнення росту та загибелі рослин.

Було доведено, що деякі молекули, які інгібують HPPD, і які інгібують трансформацію HPP в гомогентизат, зв'язуючись специфічно з ферментом, є дуже ефективними гербіцидами.

В даний час, більшість комерційно доступних гербіцидів - HPPD інгібіторів, належать до цих родин хімічних сполук:

1) трикетони, напр., сулькотріон [тобто 2-[2-хлоро-4-(метилсульфоніл)бензоїл]-1,3-циклогександіон], мезотріон [тобто 2-[4-(метилсульфоніл)-2-нітробензоїл]-1,3-циклогександіон]; темботріон [тобто 2-[2-хлоро-4-(метилсульфоніл)-3-[(2,2,2-три-фторетокси)метил] бензоїл]-1,3-цикло-гександіон]; тефурилтріон [тобто 2-[2-хлоро-4-(метилсульфоніл)-3-[[тетрагідро-2-фураніл]метокси]метил]бензоїл]-1,3-циклогександіон]; біциклопірон [тобто 4-гідрокси-3-[[2-[(2-метоксиетокси)метил]-6-(трифторметил)-3-піридиніл]карбоніл]біцикло[3.2.1]окт-3-ен-2-он]; бензобіциклон [тобто 3-(2-хлоро-4-метилбензоїл)-2-фенілтіобіцикло[3.2.1]окт-2-ен-4-он];

2) дикетонітрили, напр., 2-ціано-3-циклопропіл-1-(2-метилсульфоніл-4-трифторметилфеніл)-пропан-1,3-діон і 2-ціано-1-[4-(метилсульфоніл)-2-трифторметилфеніл]-3-(1-

метилциклопропіл)пропан-1,3-діон;

3) ізоксазоли, напр., ізоксафлутол [тобто (5-циклопропіл-4-ізоксазоліл)[2-(метилсульфоніл)-4-(трифторметил)феніл]метан]. У рослин, ізоксафлутол швидко метаболізує в DKN, сполуку дикетонітрилу, яка виявляє властивості інгібітора HPPD;

4) піразолінати, тобто, топрамезон [тобто [3-(4,5-дигідро-3-ізоксазоліл)-2-метил-4-(метилсульфоніл) феніл](5-гідрокси-1-метил-1Н-піразол-4-іл)метан], і пірасульфотол [тобто (5-гідрокси-1,3-диметилпіразол-4-іл(2-метил-4-трифторметилфеніл)метан]; піразофен [тобто 2-[4-(2,4-дихлорбензоіл)-1,3-диметилпіразол-5-ілокси]ацетофенон];

5) N-(1,2,5-оксадіазол-3-іл)бензаміди (WO 2011/035874); та

6) N-(тетразол-4-іл)- або N-(тріазол-3-іл)арилкарбоксаміди (WO2012/028579).

Ці HPPD-інгібуючі гербіциди можуть бути використані проти злаків та/або широколистяних бур'янів у посівах сільськогосподарських рослин, які виявляють метаболічну толерантність, таких як кукурудза (*Zea mays*), рис (*Oryza sativa*) та пшениця (*Triticum aestivum*), у яких вони швидко деградують (Schulz et al. (1993), FEBS letters, 318, 162-166; Mitchell et al. (2001), Pest Management Science, Vol 57, 120-128; Garcia et al. (2000), Biochem., 39, 7501-7507; Pallett et al. (2001), Pest Management Science, Vol 57, 133-142). Для того щоб розширити межі застосування цих HPPD-інгібуючих гербіцидів, було зроблено декілька спроб, для того щоб надати рослинам, зокрема, рослинам без метаболічної толерантності або з недостатньою толерантністю, рівня толерантності, прийнятного за агрономічних польових умов.

Крім намагання подолати HPPD-опосередковане утворення гомогентизату (US 6,812,010), була здійснена гіперекспресія чутливого ферменту, для того щоб продукувати кількості цільового фермента у рослин, які є достатніми для гербіцида (WO96/38567). Гіперекспресія HPPD призвела до кращої досходової толерантності до дикетонітрильних похідних (DKN) ізоксафлутолу (IFT), однак толерантність не була достатньою для післясходової обробки (Matringe et al. (2005), Pest Management Science 61: 269-276).

Третя стратегія полягала в тому, щоб отримати мутацію HPPD, для того щоб отримати цільовий фермент, який, зберігаючи здатність каталізувати трансформацію HPP в гомогентизат, є менш чутливим до HPPD інгібіторів, ніж нативний HPPD до мутації.

Ця стратегія була успішно застосована для виробництва рослин, стійких до 2-ціано-3-циклопропіл-1-(2-метилсульфоніл-4-трифторметилфеніл)-пропан-1,3-діону та до 2-ціано-1-[4-(метилсульфоніл)-2-трифторметилфеніл]-3-(1-метилциклопропіл)пропан-1,3-діону (EP496630), двох HPPD-інгібуючих гербіцидів, які належать до родини дикетонітрилів (WO 99/24585). Pro215Leu, Gly336Glu, Gly336Ile, і більш конкретно Gly336Trp (положення мутованих амінокислот показано відносно HPPD *Pseudomonas*) були ідентифіковані як мутації, відповідальні за підвищену стійкість до обробки цими дикетонітрильними гербіцидами.

Пізніше було показано, що введення гена HPPD *Pseudomonas* у пластидний геном тютюну та сої є більш ефективним, ніж ядерна трансформація, надаючи стійкості до післясходового застосування ізоксафлутолу (Dufourmantel et al. (2007), Plant Biotechnol J.5(1):118-33).

У WO 04/024928 заявники намагались підвищити біосинтез пренілхінону (напр., синтез пластохінонів, токоферолів) в клітинах рослин шляхом підвищення надходження HPP прекурсору в клітини цих рослин. Це було зроблено внаслідок зв'язування синтезу вказаного прекурсору з "шикиматним шляхом" за допомогою надекспресії PDH фермента. Вони також відзначили, що трансформація рослин з геном, який кодує PDH фермент, та геном, який кодує HPPD фермент, робить можливим підвищення стійкості вказаних рослин до HPPD інгібіторів.

У заявці на Патент WO 2009/144079 були розкриті нуклеотидні послідовності, що кодують гідроксифенілпіруват деоксигеназу (HPPD), зі специфічними мутаціями у положенні 336 в HPPD білку у *Pseudomonas fluorescens*, та їх використання для отримання рослин, стійких до гербіцидів - інгібіторів HPPD.

В WO 2002/046387, було ідентифіковано декілька доменів HPPD білків, що походять з рослин, які можуть бути відповідальними за надання стійкості до різних гербіцидів – інгібіторів HPPD, однак ні рослини, ні біохімічні дані не були представлені, для того щоб підтвердити вплив описаних функцій доменів.

В WO 2008/150473, комбінація двох відмінних механізмів толерантності – модифікований ген *Avena sativa*, який кодує мутантний HPPD фермент і CYP450 монооксигеназа кукурудзи (nsf1 ген) – була наведена, для того щоб отримати підвищену стійкість до гербіцидів - інгібіторів HPPD, однак жодні дані не були розкриті, які б свідчили про синергічний ефект, виходячи з комбінації цих обох білків.

Далі, в US20110173718, розкривається спосіб створення рослин, стійких до HPPD інгібіторів, за допомогою надекспресії не лише гена, який кодує толерантний HPPD, як, наприклад, з *Avena sativa*, однак також у комбінації з декількома рослинними генами, які кодують HST білок

(гомогенизат соланезилтрансферазу). Однак рівень толерантності до деяких обраних гербіцидів - HPPD інгібіторів був досить обмеженим.

У WO2011094199 та US20110185444 було оцінено толерантність декількох сотень ліній сої дикого типу до HPPD інгібітора - ізоксафлутолу. Дуже мало ліній виявили прийнятний рівень толерантності до гербіцидів. Був ідентифікований передбачуваний QTL (локус кількісної ознаки), відповідальний за толерантність. У цій ділянці генома був ідентифікований ген, який кодує ABC транспортер, як основну ознаку, відповідальну за підвищену стійкість до гербіциду - HPPD інгібітора, яка була виявлена. Однак, трансгенні рослини, які експресують ідентифіковані гени, не виявили жодного покращення у стійкості до досліджуваних гербіцидів - HPPD інгібіторів.

В WO2010/085705, розкрито декілька мутантів HPPD у *Avena sativa*. Було показано, що деякі варіанти виявляють підвищену толерантність *in vitro* до трикетону "мезотріон", однак, лише поодинокі мутанти експресувались в рослинах тютюну. Крім того, жодна з рослин тютюну, які експресують ці мутанти, не виявила підвищеної стійкості до мезотріону чи ізоксафлутолу у порівнянні з рослинами тютюну, які експресують ген "дикого типу" HPPD у *Avena sativa*.

US 2012/0042413 описує поліпептиди, що мають HPPD активність, однак також виявляють певну нечутливість до щонайменше одного інгібітора HPPD, а також пропонує декілька наборів мутацій у різних положеннях HPPD ферментів, і остаточно розкриває біохімічні дані, а також рівні стійкості рослин, які містять декілька таких мутуваних HPPD.

У EP 21453012, було описано декілька мутантів HPPD, однак підвищеної толерантності описаних мутантів не було продемонстровано *in planta* у порівнянні з декількома гербіцидами - HPPD інгібіторами.

Суть винаходу

Пропонуються композиції та способи для надання стійкості до гербіцидів – інгібіторів HPPD. Композиції включають HPPD поліпептиди, що є толерантними до гербіцидів - інгібіторів HPPD, та ізольовані, рекомбінантні або химерні молекули нуклеїнової кислоти, які кодують такі поліпептиди, вектори та клітини-господарі, які включають ці молекули нуклеїнової кислоти. Композиції також включають антитіла до цих поліпептидів. Нуклеотидні послідовності можуть бути використані в конструкціях ДНК або в експресійних касетах для трансформації та експресії в організмах, включаючи мікроорганізми та рослини. Нуклеотидні послідовності можуть бути синтетичними послідовностями, які були створені для експресії в організмі, включаючи, але не обмежуючись ними, мікроорганізми та рослини.

Композиції включають молекули нуклеїнової кислоти, які кодують поліпептиди стійкості до гербіцидів, включаючи молекули нуклеїнової кислоти, що кодують HPPD білок, який має одне або більше амінокислотних заміщень у положеннях, що відповідають положенням амінокислот 188, 189, 215, 335, 336, 339 та 340 в послідовності ID №:1, включаючи HPPD білок, представлені в будь-якій послідовності ID №:1, 2, 63, 64 або 65, де було введено одне або більше амінокислотних заміщень у положеннях, що відповідають положенням амінокислот 188, 189, 215, 335, 336, 339 та 340 в послідовності ID №:1, і включаючи будь-яку нуклеотидну послідовність, що кодує амінокислотні послідовності, представлені в будь-якій послідовності ID №:3-59, а також її варіанти та фрагменти. Винахід також включає білок HPPD стійкості до гербіцидів, закодований молекулами нуклеїнової кислоти, а також композиції, що включають HPPD білок.

Композиції також містять трансформовані бактерії, рослини, рослинні клітини, тканини та насіння, що є стійкими до гербіцидів – HPPD інгібіторів внаслідок введення нуклеотидної послідовності винаходу в геном бактерій, рослин, рослинних клітин та насіння. Якщо організм є рослиною, введення послідовності дозволяє застосовувати гербіциди – HPPD інгібітори до рослин для селективного знищення бур'янів, чутливих до HPPD інгібіторів чи інших нетрансформованих рослин, але не стосовно трансформованих організмів. Послідовності бути додатково використані як маркери для селекції рослинних клітин, які ростуть у присутності одного або більше гербіцидів - HPPD інгібіторів.

Додатково забезпечуються способи для ідентифікації HPPD фермента з активністю стійкості до HPPD інгібітора.

Композиції та способи винаходу використовуються для отримання організмів з підвищеною стійкістю до гербіцидів - інгібіторів HPPD. Ці організми та композиції, які включають організми, є бажаними для використання у сільському господарстві. Рослини та насіння, які включають нуклеотидну послідовність винаходу, можуть вирощуватись у полі та збиратись для отримання рослинного продукту. Композиції винаходу також використовуються для генерування змінених або покращених білків, які мають стійкість до гербіцида - HPPD інгібітора, або для детекції присутності білка, толерантного до гербіциду - інгібітора HPPD або нуклеїнових кислот у продуктах чи організмах.

Короткий опис креслень

Фігура 1 представляє вирівнювання амінокислотної послідовності HPPD з мікроорганізмів та видів рослин, включаючи *Pseudomonas fluorescens* (SEQ ID №:1), *Avena sativa* (SEQ ID №:63), варіант HPPD з *Avena sativa* (SEQ ID №:64), *Zea mays* (SEQ ID №:65), *Streptomyces avermitilis* (SEQ ID №:69), *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID №:66), *Hordeum vulgare* (SEQ ID №:67), *Daucus carota* (SEQ ID №:68), *Mycosphaerella graminicola* (SEQ ID №:70) та *Coccicoides immitis* (SEQ ID №:71).

Докладний опис винаходу

Дані винаходи зараз будуть описані більш повно з посиланням на супроводжуючі креслення, в яких представлені деякі, але не всі втілення винаходів. Дійсно, ці винаходи можуть бути втілені в багатьох різних формах і не повинні тлумачитись як обмежуючі стосовно втілень, наведених тут; швидше, ці втілення забезпечуються для того, щоб це розкриття задовольнило застосовувані юридичні вимоги. Схожі номери відповідають схожим елементам (в усьому тексті).

Багато модифікацій та інших втілень винаходів, наведених тут, спадуть на думку досвідченому фахівцеві в галузі, якої ці винаходи стосуються, отримуючи переваги від представлених вище ідей та пов'язаних з ними креслень. Відповідно, має бути зрозумілим, що ці винаходи не обмежуються специфічними розкритими втіленнями, і що модифікації та інші втілення можуть бути включені з межах формули винаходу, що додається. Не зважаючи на специфічні терміни, використані тут, вони використовуються лише у загальному та описовому сенсі і не мають на меті обмеження.

Загальний огляд

Було зроблено декілька спроб, для того щоб надати рослинам агрономічно-прийнятному рівня толерантності до широкого спектру гербіцидів - HPPD інгібіторів, включаючи вирішення проблеми HPPD-опосередкованого утворення гомогентизату (US 6,812,010), надекспресію чутливого ензима, для того щоб продукувати кількості цільового фермента в рослині, які є достатніми по відношенню до гербіциду (WO96/38567), мутування HPPD, для того щоб отримати цільовий фермент, який, зберігаючи свою здатність каталізувати трансформацію HPP в гомогентизат, є менш чутливим до HPPD інгібіторів, ніж був нативний HPPD до мутації.

Незважаючи на ці успіхи, отримані при створенні рослин, які виявляють толерантність до декількох гербіцидів - HPPD інгібіторів, описаних вище, ще існує проблема у створенні та/або покращенні толерантності рослин до нового або декількох різних HPPD інгібіторів, зокрема, HPPD інгібіторів, які належать до класів трикетонів (напр., сулькотріон, мезотріон, темботріон, бензобіциклон та біциклопірон), піразолінатів (напр., топрамезон і пірасульфотол), N-(1,2,5-Оксадіазол-3-іл)бензамідів (WO 2011/035874), і N-(тетразол-4-іл)- або N-(тріазол-3-іл)арилкарбоксамідів (WO2012/028579).

Таким чином, цей винахід забезпечує покращені композиції та способи для регулювання стійкості до гербіцида - HPPD інгібітора. Гербіциди - HPPD інгібітори, подібні до класу N-(1,2,5-оксадіазол-3-іл)бензамідів, N-(тетразол-4-іл)- або N-(тріазол-3-іл)арилкарбоксамідів, таких як 2-хлоро-3-етокси-4-(метилсульфоніл)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-іл)бензамід і 2-Хлоро-3-(метоксиметил)-4-(метилсульфоніл)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-іл)бензамід, трикетонів, таких як темботріон, сулькотріон і мезотріон, класу ізоксазолів, таких як ізоксафлутол або класу піразолінатів, таких як пірасульфотол і топрамезон, зокрема, обраних серед темботріону, сулькотріону, топрамезону, біциклопірону, тефурилтріону, ізоксафлутолу та мезотріону, має надзвичайну гербіцидну активність проти широкого спектру економічно важливих однодольних і дводольних одорічних шкідливих рослин. Активні речовини також діють ефективно на багаторічні шкідливі рослини, які утворюють пагони на кореневищах, дерев'янистих стеблах або інших багаторічних органах і які важко контролювати. Серед значень цього винаходу, "гербіцид" тлумачиться як гербіцидно активна речовина сама по собі, або така речовина, що комбінується з домішками, що змінюють її ефективність, такими як, наприклад, засоби, які підвищують її активність (синергічні агенти) або які обмежують її активність (захисні засоби). Гербіцид може також включати тверді або рідкі ад'юванти чи носії, які зазвичай використовують у технології приготування препарату (напр., природні чи регенеровані мінеральні речовини, розчинники, диспергуючі речовини, змочуючі засоби, речовини для підвищення клейкості, емульгатори, регулятори росту тощо), а також один або більше додаткових гербіцидів та/або один або більше пестицидів (напр., інсектициди, віруциди, мікробіциди, пестициди, фунгіциди, бактеріоциди, нематодіциди, молюскоциди тощо).

Методи включають трансформування організмів за допомогою нуклеотидної послідовності, що кодує ген толерантності до HPPD інгібітора винаходу або у інший спосіб вводячи такі гени стійкості до HPPD інгібітора в організми, які їх не містять (напр., шляхом схрещування, злиття

клітин або схрещування організмів, які містять інтродукований ген стійкості до HPPD інгібітора винаходу, з організмами, які його не містять, та отримання потомства, яке містить такий ген). Нуклеотидні послідовності винаходу є корисними для отримання рослин, які виявляють підвищену стійкість до гербіцидів - інгібіторів HPPD, зокрема, підвищену стійкість до гербіцидів - інгібіторів HPPD класу N-(1,2,5-оксадіазол-3-іл)бензамідів, N-(тетразол-4-іл)- або N-(тріазол-3-іл)арилкарбоксамідів, таких як 2-хлоро-3-етокси-4-(метилсульфоніл)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-іл)бензамід і 2-Хлоро-3-(метоксиметил)-4-(метилсульфоніл)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-іл)бензамід, трикетонів, таких як темботріон, сулькотріон та мезотріон, класу ізоксазолів, таких як ізоксафлутол, або класу піразолінатів, таких як пірасульфотол та топрамезон, зокрема, відібраних серед темботріону, сулькотріону, топрамезону, біциклопірону, тефурилтріону, ізоксафлутолу та мезотріону. Ген стійкості до гербіцидів - HPPD інгібіторів винаходу може також виявляти стійкість до "гербіцидів на основі похідних кумарону" (описаний в WO2009/090401, WO2009/090402, WO2008/071918, WO2008/009908). У цьому відношенні будь-який ген стійкості до гербіцидів HPPD інгібіторів винаходу також може бути експресований в рослині, яка також експресує химерний ген гомогентизат соланезил трансферази (HST) або мутований HST ген, як описано в WO2011/145015, WO2013/064987, WO2013/064964, або WO2010/029311, для отримання рослин, стійких до гербіцидів - інгібіторів HST. Як тут використовується, терміни "гербіциди на основі похідних кумарону" або "гербіциди - HST інгібітори" охоплюють сполуки, які належать за IUPAC номенклатурою до 5H-тіопірано [4,3-b]піридин-8-ол, 5H-тіопірано [3,4-b]піразин-8-ол, оксатііно [5,6-b]піридин-4-ол і оксатііно[5, 6-b]піразин-4-ол.

Таким чином, під геном "стійкості до гербіцида - HPPD інгібітора" винаходу розуміють ген, який кодує білок, що надає клітині чи організму здатність витримувати вищу концентрацію гербіциду - HPPD інгібітора, ніж така клітина чи організм, які не експресують білок, або витримувати певну концентрацію гербіцида - інгібітора HPPD протягом довшого часу, ніж така клітина чи організм, які не експресують білок, або які надають клітині чи організму здатність здійснювати фотосинтез, ріст та/або репродукцію з найменшими ушкодженнями чи уповільненням росту, які спостерігаються, ніж клітини чи організм, які не експресують такий білок. "Білок стійкості до HPPD інгібітора" включає білок, який надає клітині чи організму здатність витримувати вищу концентрацію гербіциду - інгібітора HPPD, ніж така клітина чи організм, які не експресують білок або витримувати певну концентрацію гербіциду - інгібітора HPPD протягом довшого періоду часу, ніж така клітина чи організм, які не експресують білок або які надають клітині чи організму здатність здійснювати фотосинтез, ріст та/або репродукцію з меншими ушкодженнями чи уповільненням росту, яке спостерігається, ніж такі клітини чи організм, які не експресують такий білок. Під "витримує" або "толерантність" розуміють або виживання після застосування конкретного гербіцида - HPPD інгібітора, або здатність виконувати важливі клітинні функції, такі як фотосинтез, синтез білка або дихання та репродукція у спосіб, який нелегко відрізнити від необроблених клітин чи організмів, або здатність не мати істотних відмінностей урожайності або навіть покращену урожайність для рослин, оброблених гербіцидом - HPPD інгібітором, у порівнянні з такими рослинами, не обробленими таким гербіцидом (але де бур'яни були видалені чи їх поява була попереджена механізмами, іншими, ніж застосування гербіцида - HPPD інгібітора, такими як способи, описані в WO2011/100302, що включені тут у їх повному обсязі шляхом посилання).

Крім надання клітині стійкості до HPPD інгібітора, нуклеотидна послідовність HPPD винаходу кодує поліпептиди, що мають HPPD активність, тобто, каталізують реакцію, в якій пара-гідроксифенілпіруват (pHPP) трансформується в гомогентизат. Преференційно, каталітична активність HPPD білка цього винаходу при тестуванні *in vitro*, не відрізняється від каталітичної активності референсного HPPD білка більше, ніж на 90 %, більше, ніж на 70 % або більше, ніж на 50 %, при тестуванні за ідентичних умов і при відсутності гербіцидів - інгібіторів HPPD, описаних вище. В деяких втіленнях, каталітична активність покращена у порівнянні з референсним HPPD білком. Каталітична активність HPPD фермента може бути визначена за допомогою різних методів, що є загальновідомими з рівня теніки. WO 2009/144079 описує різні прийнятні методи скринінгу.

HPPD ферменти, які виявляють підвищену стійкість до гербіцидів - інгібіторів HPPD, можуть робити це, виявляючи, порівняно з референсним HPPD: а) вище значення K_m для природного субстрату, 4-гідроксифенілпірувату; b) нижче значення k_{cat} для конвертації 4-гідроксифенілпірувату до гомогентизату; c) нижчі значення константи асоціації, K_{on} , регулюючи утворення комплексу фермент: гербіцид - HPPD інгібітор; d) підвищені значення константи дисоціації, K_{off} , регулюючи дисоціацію комплексу фермент: гербіцид - HPPD інгібітор; та/ або e) як результат, зміни одного з них або обох c) та d), підвищені значення константи рівноваги, K_i

(називається також як Kd), регулювання дисоціації комплексу фермента:гербіцида – інгібітора HPPD.

Ферментативна активність HPPD білків може бути визначена за допомогою будь-якого методу, що робить можливим або вимірювання зменшення кількості HPP чи O₂ субстратів або визначення акумулювання будь-якого продукту, що походить з ферментативної реакції, тобто гомогенізатору або CO₂. Зокрема, HPPD активність може бути визначена за допомогою способу, описаного в WO2009/144079; Garcia et al. (1997), Biochem. J. 325, 761-769; Garcia et al. (1999), Plant Physiol. 119, 1507-1516; або в WO2012/021785, які включені тут шляхом посилання.

Для мети цього винаходу, "референсний" HPPD білок (або ген HPPD) являє собою будь-який HPPD білок або нуклеїнову кислоту, з якими HPPD білок або HPPD нуклеїнова кислота винаходу порівнюються. Цей референсний HPPD може бути HPPD нативної рослини, бактеріальним або тваринним HPPD, або може бути мутованим HPPD, відомим з рівня техніки. Такі референсні HPPD можуть бути використані для визначення, чи має HPPD білок або нуклеїнова кислота винаходу конкретну властивість, що становить інтерес (напр., покращену, порівнянну або знижену стійкість до гербіцида - HPPD інгібітора чи HPPD ферментативну активність; покращену, порівнянну або знижену експресію в клітині-господарі; покращену, порівнянну або знижену стабільність білка, тощо).

У різних втіленнях тут, нуклеїнова кислота толерантного гербіциду - HPPD інгібітора (включаючи ізолюваний, рекомбінантний або химерний гени, що включають цю нуклеїнову кислоту; вектори, клітини-господарі, рослини, частини рослин та насіння, які включають нуклеїнову кислоту, насіння, що включає нуклеїнову кислоту, HPPD поліпептиди та їх композиції, закодовані нуклеїновою кислотою, а також способи використання нуклеїнової кислоти для підвищення толерантності рослин до гербіцидів - інгібіторів HPPD, зокрема, підвищення толерантності до гербіцидів - інгібіторів HPPD класу N-(1,2,5-оксадіазол-3-іл)бензамідів, N-(тетразол-4-іл)- або N-(тріазол-3-іл)арилкарбоксамідів, таких як 2-хлоро-3-етокси-4-(метилсульфоніл)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-іл)бензамід і 2-Хлоро-3-(метоксиметил)-4-(метилсульфоніл)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-іл)бензамід, трикетонів, таких як темботріон, сулькотріон та мезотріон, класу ізоксазолів, таких як ізоксафлутол, або класу піразолінатів, таких як пірасульфотол і топрамезон, особливо, відібраних серед темботріону, сулькотріону, топрамезону, біциклопірону, тефурилтріону, ізоксафлутолу та мезотріону) кодує HPPD білок, який був модифікований шляхом введення одного або більше амінокислотних заміщень, включаючи 2, 3, 4, 5, 6 або 7 амінокислотних заміщень, в положеннях, що відповідають положенням амінокислот 188, 189, 215, 335, 336, 339 та/або 340 в послідовності ID №:1. Під "відповідне" стосується положення нуклеотиду або амінокислоти порівняно з їх положенням в SEQ ID №:1, коли дві (або більше) послідовності вирівнюються з використанням стандартних алгоритмів вирівнювання, описаних тут. Характерне вирівнювання послідовності ID №:1 з HPPD амінокислотними послідовностями з різних видів мікроорганізмів та рослин представлено на Фігурі 1. Наприклад, положення амінокислот 188, 189, 215, 335, 336, 339 та 340 у послідовності ID №:1 відповідає положенню амінокислот 241, 242, 271, 412, 413, 416 та 417, відповідно, HPPD з *Avena sativa* (SEQ ID №:63); положенню амінокислот 235, 236, 265, 406, 407, 410 та 411, відповідно, HPPD з *Hordeum vulgare* (SEQ ID №:67) і положенню амінокислот 242, 243, 272, 413, 414, 417 та 418, відповідно, HPPD із *Zea mays* (SEQ ID №:65). Таким чином, залежно від довжини HPPD амінокислотної послідовності, що становить інтерес, яка має або додаткові чи менше залишків, ніж послідовність в SEQ ID №:1, відповідне положення може бути розташоване в положенні, відмінному від положень 188, 189, 215, 335, 336, 339 та 340 в такому HPPD білку, який становить інтерес.

В одному втіленні, HPPD цього винаходу був модифікований включенням одного або більше амінокислотних заміщень, обраних з групи, яка включає:

(a) триптофан, гліцин або серин в амінокислотному положенні, що відповідає положенню амінокислоти 188 в послідовності ID №:1;

(b) серин, цистеїн або аргінін в амінокислотному положенні, що відповідає положенню амінокислоти 189 в послідовності ID №:1;

(c) пролін, серин, гістидин, аланін, гліцин чи глутамін в амінокислотному положенні, що відповідає положенню амінокислоти 335 в послідовності ID №:1;

(d) серин чи триптофан в амінокислотному положенні, що відповідає положенню амінокислоти 336 в послідовності SEQ ID №:1;

(e) треонін, аланін чи серин в амінокислотному положенні, що відповідає положенню амінокислоти 339 в послідовності SEQ ID №:1;

(f) глутамін, аланін, валін чи глутамінова кислота в амінокислотному положенні, що відповідає положенню амінокислоти 340 в послідовності SEQ ID №:1; та

5

(a) триптофан в амінокислотному положенні 188 і триптофан в амінокислотному положенні 336; або

(b) пролін в амінокислотному положенні 335.

10

15

20

25

30

35

(f) пролін в амінокислотному положенні, яке відповідає положенню амінокислоти 335 в послідовності SEQ ID №1.

40

45

50

55

60

відповідає положенню амінокислоти 339 в послідовності SEQ ID №:1, і глутамін в амінокислотному положенні, що відповідає положенню амінокислоти 340 в послідовності SEQ ID №:1;

5 (с) триптофан в амінокислотному положенні, що відповідає положенню амінокислоти 188 в послідовності SEQ ID №:1, і триптофан в амінокислотному положенні, що відповідає положенню амінокислоти 336 в послідовності SEQ ID №:1;

(d) пролін в амінокислотному положенні, яке відповідає положенню амінокислоти 335 в послідовності SEQ ID №:1, серин в амінокислотному положенні, що відповідає положенню амінокислоти 336 в послідовності SEQ ID №:1, і глутамінова кислота в амінокислотному положенні, що відповідає положенню амінокислоти 340 в послідовності SEQ ID №:1;

10 (е) пролін в амінокислотному положенні, яке відповідає положенню амінокислоти 335 в послідовності SEQ ID №:1, триптофан в амінокислотному положенні, що відповідає положенню амінокислоти 336 в послідовності SEQ ID №:1; аланін в амінокислотному положенні, що відповідає положенню амінокислоти 339 в послідовності SEQ ID №:1, і глутамін в амінокислотному положенні, що відповідає положенню амінокислоти 340 в послідовності SEQ ID №:1; або

15 (f) пролін в амінокислотному положенні, яке відповідає положенню амінокислоти 335 в послідовності SEQ ID №:1.

20 Будь-яка HPPD послідовність може бути модифікована введенням одного або більше заміщень, розкритих тут. Наприклад, HPPD винаходу також охоплює будь-які природні бактеріальні, рослинні або тваринні HPPD ферменти, які були модифіковані введенням одного або більше заміщень, описаних supra.

Для отримання HPPD білка цього винаходу, вихідна амінокислотна послідовність існуючого білка має бути модифікована людиною шляхом заміщення щонайменше однієї амінокислоти, як визначено у цій заявці, що найлегше зробити за допомогою модифікації ДНК, кодує такої білок, заміщуючи певний кодон іншим кодоном, який кодує іншу амінокислоту.

25 Типові послідовності HPPD, які можуть бути модифіковані згідно з цим винаходом, включають послідовності з бактерій, наприклад, виду *Pseudomonas* sp., наприклад *Pseudomonas fluorescens*, або, у протилежному випадку, ціанобактерій роду *Synechocystis*.
30 Послідовність може також мати рослинне походження, зокрема, походити від дводольних рослин, зонтичних рослин, або – від однодольних рослин. Кращі приклади, які можна навести, - це рослини, такі як тютюн, *Arabidopsis*, *Daucus carota*, *Zea mays* (кукурудза), пшениця, ячмінь, *Avena sativa*, *Brachiaria platyphylla*, *Cenchrus echinatus*, *Lolium rigidum*, *Festuca arundinacea*, *Setaria faberi*, *Eleusine indica*, *Sorghum*, *Cenchrus echinatus*, *festuca arundinacea*. Кодуючі
35 послідовності, спосіб їх виділення та клонування, є відомі з рівня техніки або описані тут в іншому місці (напр., SEQ ID №:63-76). У конкретному втіленні винаходу, HPPD, який може бути модифікований згідно з цим винаходом, має бактеріальне походження, зокрема, з *Pseudomonas* sp., більш конкретно з *Pseudomonas fluorescens*, *Rhodococcus* sp., *Blepharisma japonicum*, *Synechococcus* sp., *Picrophilus torridus*, *Kordia algicida* або має рослинне походження,
40 включаючи, з *Arabidopsis thaliana*, *Sorghum bicolor* або *oyza sativa*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Lolium rigidum* або *Avena sativa*.

Для досягнення мети цього винаходу, HPPD винаходу може також включати наступні модифікації, наприклад, при яких деякі амінокислоти (напр., від 1 до 10 амінокислот) були заміщені, вставлені або видалені з метою клонування, для злиття транзитного пептиду, і т.п., які зберігають HPPD активність, тобто властивість каталізувати перетворення пара-гідроксибенілпірувату до гомогентизату, або може бути будь-який HPPD, який може далі бути покращений. Наприклад, HPPD, який додатково може бути покращений в результаті модифікацій, описаних тут, може бути варіантом HPPD, що походить від *Pseudomonas fluorescens*, наведеним тут як SEQ ID №:2, варіантом HPPD з *Avena sativa*, наведеним тут як
50 SEQ ID №:64, варіантом послідовності HPPD, представленої в будь-якій послідовності SEQ ID №:3-326, 383-389, 393, 395 та 397-459 в WO2012/021785, які включені тут у їх повному обсязі шляхом посилання; послідовності HPPD, представлені в будь-якій послідовності SEQ ID №:2-14 та 20-50 WO2011/068567, які включені тут у їх повному обсязі шляхом посилання; послідовності HPPD, представлені в будь-якій послідовності SEQ ID №:15-26 заявки WO2010/085705, які
55 включені тут у їх повному обсязі шляхом посилання; HPPD, що має одне або більше заміщень, описаний в WO09/144079 або в Патенті США 6,245,968, кожен з яких включений тут у їх повному обсязі шляхом посилання; HPPD, що має одне або більше заміщень, описаних в Таблицях 1, 2, 5 або 6 WO2010/085705; та/або HPPD, що має одне або більше заміщень, описаних в Таблиці 1 WO2011/068567.

60 У деяких втіленнях нуклеотидна послідовність винаходу (включаючи їх ізольовані,

рекомбінантні та химерні гени, вектори, клітини-господарі, рослини, частини рослин та насіння, які включають нуклеотидну послідовність, амінокислотні послідовності та композиції з них, закодовані нуклеотидною послідовністю, а також способи використання послідовності нуклеїнової кислоти для підвищення стійкості рослин до гербіцидів - інгібіторів HPPD, зокрема, підвищення стійкості до гербіцидів - інгібіторів HPPD класу N-(1,2,5-оксадіазол-3-іл)бензамідів, N-(тетразол-4-іл)- або N-(тріазол-3-іл)арилкарбоксамідів, таких як 2-хлоро-3-етокси-4-(метилсульфоніл)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-іл)бензамід та 2-Хлоро-3-(метоксиметил)-4-(метилсульфоніл)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-іл)бензамід, трикетонів, таких як темботріон, сулькотріон і мезотріон, ізоксазолів, таких як ізоксафлутол, або класу піразолінатів, таких як пірасульфотол і топрамезон, зокрема, відібраних серед темботріону, сулькотріону, топрамезону, біциклопірону, тефурилтріону, ізоксафлутолу та мезотріону) кодує амінокислотну послідовність, наведену в будь-якій одній серед послідовностей SEQ ID №:3-59, та її фрагменти і варіанти, що кодують стійкість до поліпептиду - гербіциду - HPPD інгібітора. Таким чином, в цьому втіленні, HPPD винаходу включає амінокислотну послідовність, представлену в будь-якій послідовності SEQ ID №:3-59, та її фрагменти і варіанти, які надають стійкості до гербіцидів - інгібіторів HPPD клітині-господарю.

А. Способи для визначення стійкості до HPPD інгібітора

Будь-який прийнятний спосіб для визначення толерантності до гербіцидів - інгібіторів HPPD може бути використаний для з'ясування послідовності HPPD винаходу. Стійкість може бути визначена шляхом моніторингу здатності клітин чи організму виживати після застосування конкретного гербіциду - HPPD інгібітора, або здатності здійснювати важливі клітинні функції, такі як фотосинтез, синтез білка чи дихання і репродукція у спосіб, який практично не можна відрізнити від необроблених клітин чи організмів, або здатності не мати істотної відмінності врожайності або навіть покращену врожайність для рослин, які було оброблено гербіцидом - HPPD інгібітором, у порівнянні з такими рослинами, не обробленими таким гербіцидом (або де бур'яни були видалені або їх поява була попереджена за допомогою механізму, який є іншим, ніж застосування гербіциду - HPPD інгібітора). В деяких втіленнях, стійкість може бути визначена за візуальними фенотиповими ознаками клітини чи організму, трансформованих за допомогою нуклеїнової кислоти, яка включає ген, що кодує відповідний HPPD білок, або в дослідженні HPPD білка *in vitro*, у присутності різних концентрацій різних HPPD інгібіторів. Залежність "доза-ефект" та відносна зміщення цієї залежності, асоційоване з цими показниками фенотипу (утворення коричневого кольору, уповільнення росту, втрата кольору (знебарвлення), гербіцидний ефект тощо) традиційно виражаються в термінах, наприклад, GR50 (концентрація для 50 % уповільнення росту) або MIC (мінімальна концентрація інгібітора) значеннями, де зростання значень відповідає зростанню властивості толерантності експресованого HPPD, у звичайний спосіб, виходячи з ушкодження рослини, симптомів меристематичного знебарвлення, тощо в інтервалі різних концентрацій гербіцидів. Ці дані можуть бути представлені в термінах, наприклад, GR50 значення походить від кривої залежності доза/ефект, на якому значення "دوزи" відкладені на осі X, а значення "відсоток знижених", "гербіцидний ефект", "кількість зелених рослин, що з'являються" тощо, відкладені на осі Y, де підвищені GR50 значення відповідають підвищеним рівням толерантності, властивим експресованому HPPD. Гербіциди можуть відповідним чином бути застосовані перед появою сходів або після їх появи.

У різних втіленнях скринінг рівня толерантності нуклеїнової кислоти або гена, що кодують HPPD білок згідно з винаходом, або HPPD білка винаходу може бути здійснений через трансгенез, регенерацію, схрещування, тестове обприскування досліджуваних рослин, таких як тютюн або сільськогосподарські культури, такі як соя чи бавовник. Відповідно до результатів, отриманих внаслідок такого скринінгу, такі рослини є більш толерантними, бажано толерантними до щонайменше у 2 рази більшої від нормальної дози, рекомендованої для застосування у польових умовах, навіть більш переважно толерантними до 4 разів більшої від нормальної дози, рекомендованої для застосування у польових умовах, до HPPD інгібіторів (напр., гербіцидів - HPPD інгібіторів класу N-(1,2,5-оксадіазол-3-іл)бензамідів, N-(тетразол-4-іл)- або N-(тріазол-3-іл)арилкарбоксамідів, таких як 2-хлоро-3-етокси-4-(метилсульфоніл)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-іл)бензамід і 2-Хлоро-3-(метоксиметил)-4-(метилсульфоніл)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-іл)бензамід, трикетонів, такі як темботріон, сулькотріон і мезотріон, класу ізоксазолів, таких як ізоксафлутол, або класу піразолінатів, таких як пірасульфотол і топрамезон, зокрема, обраних серед темботріону, сулькотріону, топрамезону, біциклопірону, тефурилтріону, ізоксафлутолу та мезотріону), ніж такі рослини, що не містять будь-якого екзогенного гена, який кодує HPPD білок, або ніж рослини, які містять ген, що несе референсну HPPD-кодуєчу ДНК, наприклад, HPPD-кодуєчу ДНК *Arabidopsis thaliana*, під контролем того ж промотора, що й нуклеїнова кислота, яка кодує HPPD білок винаходу. Відповідно, термін

"здатний підвищувати толерантність рослин до щонайменше одного гербіциду, який діє на HPPD", означає толерантність рослини, яка експресує HPPD винаходу до щонайменше 2х, або 3х, або 4х, або більше, нормальної польової дози гербіцида - HPPD інгібітора у порівнянні з рослиною, яка лише експресує ендогенний HPPD, або з рослиною, яка експресує референсний HPPD фермент. У цьому відношенні, термін "гербіцид, який діє на HPPD" не обмежений речовинами, які відомі та/або використовуються як гербіциди, а стосується будь-яких речовин, що інгібують каталітичну активність HPPD білків.

Альтернативно, при кількісному рівні дані типу pl_{50} (pl_{50} -величина означає \log значення концентрації інгібітора, необхідного для інгібування 50 % активності фермента в молярній концентрації) можуть бути отримані для HPPD білка винаходу у порівнянні з послідовністю референсного HPPD у присутності чи за відсутності будь-якого відповідного гербіцида – інгібітора HPPD.

Специфічним, але необмежуваним, типом кількісного аналізу, що може бути використаний, для того щоб оцінити послідовності HPPD винаходу, є колориметричний аналіз. У цьому аналізі, культуральне середовище YT-broth-типу з 1 % агарози, 5mM L-тирозину та 42mM сукцинату, що містить селективний агент для вектора pSE420 (Invitrogen, Карлсруе, Німеччина) або модифіковану версію pSE420 (pSE420(RI)NX), розливали в глибокі планшети з комірками. Культура *E. coli* у фазі експоненціального росту, що містить вектор pSE420-HPPDx (HPPDx означає будь-який ген, який кодує очікуваний HPPD фермент/білок), додається до кожної комірки. Через 16 годин при 37 °C, комірки, які не містять культурального середовища, і ті комірки, до яких додавали культуру *E. coli*, що містить "пустий" вектор pSE420, є прозорими, або ті, до яких додавали культуру *E. coli*, що містить вектор pSE420-HPPDx, що містить ген, який кодує неактивний HPPD, є прозорими; натомість комірки, до яких додавали культуру *E. coli*, яка містить вектор pSE420-HPPDx, кодує активний HPPD, стають коричневими. Раніше було показано, що цей тест відображає HPPD активність, яким би не було походження цієї активності, і дозволяє ідентифікувати HPPD активність (US 6,768,044), тобто на кількісному рівні.

В. Способи введення мутацій в послідовності HPPD

У мutowаному HPPD білку, закодованому нуклеїновою кислотою винаходу, щонайменше одна амінокислота була заміщена, як визначено вище.

Заміщення може бути здійснене у послідовності нуклеїнової кислоти, яка кодує референсний HPPD, як визначено вище, за допомогою будь-яких засобів, що прийнятні для заміщення, у вказаній послідовності, кодон, який кодує амінокислоту, для того щоб бути заміщеним на кодон, який відповідає амінокислоті, що повинна замінити його, за допомогою вказаних кодонів, широко описана в літературі і добре відома кваліфікованому фахівцеві.

Декілька молекулярно-біологічних методів можуть бути використані для здійснення цього заміщення. Метод для отримання мutowаної послідовності нуклеїнової кислоти згідно з винаходом та відповідного білка включає застосування сайт-спрямованого мутагенезу щодо кодонів, які кодують одну або більше амінокислот, обраних заздалегідь. Методи для отримання мутацій із застосуванням сайт-спрямованого мутагенезу добре відомі для кваліфікованих фахівців і широко описані в літературі (зокрема: Directed Mutagenesis: A Practical Approach, 1991, Edited by M.J. McPHERSON, IRL PRESS), або це способи, для яких можна використовувати комерційні набори (наприклад, набір для сайт-спрямованого мутагенезу QUIKCHANGE™, від Qiagen). Після сайт-спрямованого мутагенезу, корисно відібрати клітини, які містять мutowаний HPPD, що є менш чутливим до HPPD інгібітора, з використанням відповідних засобів для скринінгу. Прийнятні методи скринінгу для досягнення цього були описані вище.

Альтернативно, послідовність ДНК, що кодує референсний HPPD, може бути модифікована *in silico* для кодування HPPD білка, який має одне або більше заміщень, викладених тут, і після цього синтезований *de novo*. Нуклеотидна послідовність, що кодує мutowаний HPPD білок, може бути введена в клітину-господар, яка тут описується в іншому місці.

А. Ізольовані полінуклеотиди, їх варіанти та фрагменти

У деяких втіленнях, цей винахід включає ізольовані або рекомбінантні полінуклеотиди. "Ізольований" або "рекомбінантний" полінуклеотид чи поліпептид/білок або біологічно активна його частина, як тут визначено, більше не присутня в її оригінальному, нативному організмі, натомість міститься в гетерологічній клітині-господарі або в трансгенній рослинній клітині, насінні чи рослині. В одному втіленні, "ізольований" полінуклеотид є вільний від послідовностей (наприклад, послідовностей, які кодують білок, чи регуляторних послідовностей), які у природі фланкують нуклеїнову кислоту (тобто, послідовностей, розташованих на 5' і 3'-кінцях нуклеїнової кислоти) в геномній ДНК організму, з якого походить полінуклеотид. Термін

"рекомбінантний" охоплює полінуклеотиди чи поліпептиди, з якими відбулись маніпуляції порівняно з нативним полінуклеотидом чи поліпептидом, в результаті чого полінуклеотид або поліпептид відрізняється (напр., за хімічним складом чи структурою) від того, що зустрічається в природі. В іншому втіленні, "ізолюваний" або "рекомбінантний" полінуклеотид є вільним від внутрішніх послідовностей (тобто інтронів), які у природі мають місце в геномній ДНК організму, з якого полінуклеотид походить. Типовим прикладом такого полінуклеотиду є так звана комплементарна ДНК (кДНК). Наприклад, в різних втіленнях ізолюваний полінуклеотид, який кодує стійкість до гербіцида - HPPD інгібітора, може містити менше, ніж приблизно 5 т.п.н., 4 т.п.н., 3 т.п.н., 2 т.п.н., 1 т.п.н., 0,5 т.п.н. або 0,1 т.п.н. нуклеотидної послідовності, яка природньо фланкує полінуклеотид у геномній ДНК клітин, з яких полінуклеотид походить. Молекули нуклеїнової кислоти винаходу включають ті молекули нуклеїнової кислоти, що кодують HPPD винаходу, включаючи, наприклад, нуклеотидні послідовності, представлені в будь-якій послідовності SEQ ID №:60-62.

Цей винахід також передбачає варіанти і фрагменти будь-якої нуклеотидної послідовності, що кодує амінокислотні послідовності, представлені в будь-якій послідовності SEQ ID №:3-59. "Фрагмент" полінуклеотиду може кодувати біологічно активну частину полінуклеотиду, або він може бути фрагментом, який може бути використаний як гібридизаційний зонд або ПЛР-праймер за допомогою методів, розкритих тут в іншому місці. Полінуклеотиди, які є фрагментами полінуклеотиду, включають щонайменше приблизно 15, 20, 50, 75, 100, 200, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150 суміжних нуклеотидів, або кількість нуклеотидів, присутніх у нативному (повному) поліпептиді, розкритому тут, залежно від призначення використання (напр., HPPD нуклеїнової кислоти, розкритої тут). Під "суміжними" нуклеотидами розуміють нуклеотидні залишки, які безпосередньо прилегли один до одного.

Фрагменти полінуклеотидів цього винаходу загалом кодуватимуть поліпептидні фрагменти, які зберігають біологічну активність непроцесованого білка стійкості до гербіциду - HPPD інгібітора; тобто, гербіцидо-толерантну активність. Під "зберігає активність стійкості до гербіциду" розуміють, що фрагмент матиме щонайменше приблизно 30 %, щонайменше приблизно 50 %, щонайменше приблизно 70 %, щонайменше приблизно 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 110 %, 125 %, 150 %, 175 %, 200 %, 250 %, щонайменше приблизно 300 % або більше активності стійкості до гербіциду непроцесованого білка - HPPD інгібітора, розкритого тут як SEQ ID №:2. Способи для визначення активності стійкості до гербіциду добре відомі з рівня техніки, тут розкриваються типові способи. У необмежуючому прикладі, фрагмент винаходу буде стійким до тієї ж самої дози гербіциду – інгібітора HPPD, або стійким до 2х, 3х, 4х, або вищої дози гербіциду – інгібітора HPPD, або фрагменти будуть настільки ж стійкими або більш стійкими, виходячи з $rl50$ або Ki між фрагментом та SEQ ID №:2.

Фрагмент полінуклеотиду, який кодує біологічно активну частину полінуклеотиду винаходу, кодуватиме щонайменше приблизно 150, 175, 200, 250, 300, 350 суміжних амінокислот, або навіть загальну кількість амінокислот, присутніх у повному (непроцесованому) полінуклеотиді винаходу. У необмежуючому прикладі, фрагмент полінуклеотиду, який кодує біологічно активну частину полінуклеотиду винаходу, включає одне або більше положень амінокислот 188, 189, 215, 335, 336, 339 та 340 у послідовності SEQ ID №:2.

Винахід також охоплює варіанти полінуклеотидів, які описані *supra*. "Варіанти" полінуклеотида також включають ті послідовності, які кодують HPPD винаходу, але які відрізняються консервативно через виродженість генетичного коду, а також ті, що є значною мірою ідентичними. Варіанти цього винаходу зберігатимуть ферментативну активність HPPD та стійкість до гербіцидів – інгібіторів HPPD. Термін "значною мірою ідентичний" означає поліпептид або полінуклеотидну послідовність, яка має щонайменше приблизно 60 % або 65 % ідентичності послідовності, приблизно 70 % або 75 % ідентичності послідовності, приблизно 80 % або 85 % ідентичності послідовності, приблизно 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичності послідовності при порівнянні з контрольною послідовністю за допомогою однієї з програм вирівнювання з використанням стандартних параметрів. Будь-який фахівець з досвідом роботи зрозуміє, що ці значення можуть бути належним чином пристосовані для визначення відповідної ідентичності поліпептидів, закодованих двома полінуклеотидами, беручи до уваги виродженість кодону, амінокислотну подібність, розташування рамки зчитування, тощо.

Бактеріальні гени досить часто мають множинні кодони ініціації метіоніну, розташовані близько до стартового кодону відкритої рамки зчитування. Часто ініціація трансляції в одному або більше з цих стартових кодонів приводить до утворення функціонального білка. Ці стартові кодони можуть включати ATG кодони. Однак, бактерії, такі як *Bacillus* sp., також розпізнають

GTG кодон як стартовий кодон, і білки, які ініціюють трансляцію в GTG кодонах, містять метіонін як першу амінокислоту. Крім того, часто а priori не визначено, який з цих кодонів використовується в природі у бактерій. Таким чином, зрозуміло, що використання одного з альтернативних кодонів метіоніну може призвести до генерування варіантів, які надають

5 стійкості до гербіцидів. Ці стійкі до гербіцидів білки охоплені цим винаходом і можуть бути використані у способах цього винаходу. Алейні варіанти, які трапляються у природі, можуть бути ідентифіковані за допомогою загальновідомих молекулярно-біологічних методик, таких полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР) та методики гібридизації, як описано нижче. Варіанти полінуклеотидів також включають синтетичні полінуклеотиди, які бути отримані, наприклад, за

10 допомогою сайт-спрямованого мутагенезу або інших стратегій мутагенезу, які, однак, кодуєть поліпептид, що має бажану біологічну активність.

Досвідчений фахівець також має збагнути, що зміни можуть бути введені подальшими мутаціями в полінуклеотидах винаходу, що в результаті призводить до додаткових змін в амінокислотній послідовності закодованих поліпептидів, без зміни біологічної активності

15 поліпептидів. Таким чином, варіанти ізольованих поліпептидів можуть бути створені шляхом введення одного або більшої кількості додаткових нуклеотидних заміщень, вставок або делецій у відповідний поліпептид, що кодує HPPD винаходу, таких як 1-5, 1-10 або 1-15 амінокислотних заміщень, вставок або делецій або 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 чи 15 амінокислотних заміщень, вставок або делецій, вводяться у закодований поліпептид. Також мутації можуть бути

20 введені за допомогою стандартних методик, таких як сайт-спрямований мутагенез (сайт-специфічний мутагенез) і ПЛР-опосередкований мутагенез або методик "перетасування" генів. Такі варіанти полінуклеотидів також охоплені цим винаходом.

Варіанти полінуклеотидів можуть бути отримані шляхом введення мутацій, випадково розташованих уздовж всієї або частини кодуєчої послідовності, за допомогою насичуючого мутагенезу або пермутаційного мутагенезу; може бути проведений скринінг отриманих мутантів

25 на здатність надавати активності стійкості до гербіцидів, для ідентифікації мутантів, що зберігають активність.

Додаткові методи для отримання варіантів включають піддавання клітини, яка експресує білок, розкритий тут (або їх бібліотеки), специфічним умовам, що створюють стрес для

30 активності білка. Специфічні умови можуть включати (але не обмежені ними) зміни температури, зміни pH та зміни концентрацій субстратів або інгібіторів. Білкова бібліотека може піддаватись цим умовам упродовж часу експресії білка (напр., у *E. coli* або іншому господареві) або наступного створення білкового екстракту, або наступної очистки білка.

Функціональна або ферментативна активність "білкових бібліотек", які піддавались стресовим умовам, можуть після цього порівнюватись з референсним білком, для того щоб ідентифікувати білки з покращеними властивостями. Порівняння активності може бути здійснене як частина скринінгу росту або альтернативно як частина ферментативного аналізу, який кількісно оцінює активність білка. Властивості, що можуть бути ідентифіковані як покращені, включають стійкість до гербіцида - HPPD інгібітора, зміни кінетичних констант

40 (включаючи K_m , K_i , V_{max}), стабільність білка, термостабільність білка або температурного оптимуму білка.

C. Ізольовані білки та їх варіанти і фрагменти

Поліпептиди стійкості до гербіциду також охоплені цим винаходом. Поліпептид стійкості до гербіциду включає препарати поліпептидів, що мають менше, ніж приблизно 30 %, 20 %, 10 %

45 або 5 % (від сухої ваги) поліпептиду, що не має стійкості до гербіцидів (також тут називається як "контамінуючий білок"). У цьому винаході, "білок стійкості до гербіциду" означає розкритий тут HPPD поліпептид. Забезпечуються також фрагменти, біологічно активні частини та їх варіанти, які можуть бути використані при застосуванні на практиці способів цього винаходу.

Терміни "фрагменти" або "біологічно активні частини" включають фрагменти поліпептидів, що несуть частини амінокислотної послідовності, яка кодує білок стійкості до гербіциду і який зберігає активність стійкості до гербіциду. Біологічно активна частина білка стійкості до гербіциду може являти собою поліпептид, який має, наприклад, 10, 25, 50, 100 або більше амінокислот у довжину. Такі біологічно активні частини можуть бути отримані за допомогою

50 рекомбінантних методик та оцінені щодо стійкості до гербіциду.

Під "варіантами" розуміють білки або поліпептиди, що мають амінокислотну послідовність, яка є щонайменше приблизно на 60 %, 65 %, приблизно 70 %, 75 %, приблизно 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичною до будь-якої послідовності SEQ ID №:3-59, де вказаний варіант має стійкість до HPPD фермента і стійкість до гербіцида - HPPD інгібітора. Будь-який досвідчений фахівець в галузі збагне, що ці значення

60 можуть бути належним чином узгоджені для визначення відповідної ідентичності поліпептидів,

закодованих двома полінуклеотидами, беручи до уваги виродженість кодону, подібність амінокислот, положення рамки зчитування, тощо.

Наприклад, консервативні амінокислотні заміщення можуть бути здійснені за одним або більше несуттєвими амінокислотними залишками. "Несуттєвий" амінокислотний залишок – це залишок, який може бути змінений в референсній послідовності поліпептиду без зміни біологічної активності, натомість "незамінний" амінокислотний залишок потрібен для біологічної активності. "Заміщення консервативних амінокислот" полягає в тому, що один амінокислотний залишок заміщується амінокислотним залишком, який має подібний бічний ланцюг. Родини амінокислотних залишків, які мають подібні бічні ланцюги, були визначені з рівня техніки. Такі родини включають амінокислоти з основними бічними ланцюгами (напр., лізин, аргінін, гістидин), кислотними бічними ланцюгами (напр., аспарагінова кислота, глутамінова кислота), незарядженими полярними бічними ланцюгами (напр., гліцин, аспарагін, глутамін, серин, треонін, тирозин, цистеїн), неполярними бічними ланцюгами (напр., аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін, триптофан), бета-розгалуженими бічними ланцюгами (напр., треонін, валін, ізолейцин) та ароматичними бічними ланцюгами (напр., тирозин, фенілаланін, триптофан, гістидин). Амінокислотні заміщення можуть бути здійснені в неконсервативних ділянках, які зберігають функцію. Загалом, такі заміщення не повинні б здійснюватись для консервативних амінокислотних залишків або для амінокислотних залишків в межах консервативного мотиву, де такі залишки є незамінними для поліпептидної активності. Однак, кожен фахівець в галузі має зрозуміти, що функціональні варіанти можуть мати незначні консервативні або неконсервативні зміни консервативних залишків.

Антитіла до HPPD цього винаходу або до їх варіантів чи фрагментів також охоплені винаходом. Способи отримання антитіл добре відомі в галузі з рівня техніки (див., наприклад, Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; Патент США No. 4,196,265).

Таким чином, один аспект винаходу стосується антитіл, одноланцюгових антигензв'язуючих молекул або інших білків, які специфічно зв'язуються з однією або більше білковими або пептидними молекулами винаходу та їх гомологами, гібридними (злитими) молекулами або їх фрагментами. У конкретному кращому втіленні, антитіло специфічно зв'язується з білком, який має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID №:3-59, або його фрагментом. В іншому втіленні, антитіло специфічно зв'язується з гібридним білком, що включає амінокислотну послідовність, обрану з амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID №:3-59, або його фрагментом.

Антитіла винаходу можуть бути використані для кількісного або якісного виявлення молекул білка або пептиду винаходу, або виявлення посттрансляційних модифікацій білків. Як тут використовується, говорять, що антитіло або пептид "специфічно зв'язується" з білковою чи пептидною молекулою винаходу, якщо таке зв'язування конкурентно не інгібується присутністю неспоріднених молекул.

Д. Генне "пакетування"

У комерційному виробництві сільськогосподарських культур бажано елімінувати за допомогою надійного пестицидного менеджменту небажані рослини (тобто, "бур'яни") з поля, на якому вирощуються сільськогосподарські рослини. Ідеальною була б обробка, яка б застосовувалась до цілого поля, але б знищувала лише небажані рослини, при цьому рослини сільськогосподарських культур залишалися невраженими. Така система обробки повинна була б залучати використання сільськогосподарських рослин, які є толерантними до гербіциду, внаслідок чого гербіцид розбризкується на полі сільськогосподарських рослин, які є толерантними до дії гербіцидів, сільськогосподарські рослини продовжували б процвітати, натомість нетолерантні до дії гербіцидів бур'яни знищуються або серйозно пошкоджуються. В ідеалі такі системи обробки мали б переваги при різних властивостях гербіцидів, внаслідок чого система захисту рослин могла б забезпечити найкращу можливу комбінацію гнучкості та економічності. Наприклад, окремі гербіциди мають різну тривалість життя у польових умовах, деякі гербіциди зберігаються і є ефективними протягом відносно тривалого часу, після того як вони застосовувались; натомість інші гербіциди швидко розпадаються на інші та/або неактивні сполуки. Ідеальна система обробки забезпечувала б використання різних гербіцидів, внаслідок чого виробники сільськогосподарської продукції могли б узгодити вибір гербіцидів для конкретної ситуації.

Оскільки низка гербіцидотолерантних сільськогосподарських рослин наразі є комерційно доступною, питання, що виникло для багатьох комерційних гербіцидів і комбінацій гербіцид / сільськогосподарська культура, полягає в тому, що окремі гербіциди здебільшого мають неповний спектр активності проти видів бур'янів. Для багатьох окремих гербіцидів, які

використовувались протягом певного часу, популяції видів бур'янів, резистентних до гербіцидів, стали більш розповсюдженими (див., напр., Tranel and Wright (2002) *Weed Science* 50: 700-712; Owen and Zelaya (2005) *Pest Manag. Sci.* 61: 301-311). Були описані трансгенні рослини, що є толерантними більше, ніж до одного гербіцида (див., напр., WO2005/012515). Однак, покращення кожного аспекту виробництва сільськогосподарських рослин, вибір засобів захисту рослин, розширення залишкової боротьби з бур'янами та покращення врожайності сільськогосподарських культур є постійно необхідними.

HPPD білок або нуклеотидна послідовність винаходу переважно комбінуються в рослинах з іншими генами, які кодують білки, або молекулами РНК, які надають корисних агрономічних властивостей таким рослинам. Серед генів, які кодують білки або РНК, що надають корисних агрономічних властивостей трансформованим рослинам, слід згадати послідовності ДНК, що кодують білки, які надають стійкості до одного або більше гербіцидів, які, згідно з їхньою хімічною структурою, відрізняються від гербіцидів – інгібіторів HPPD, та інші, які надають стійкості до певних комах, тим, що надають толерантність до певних захворювань, ДНК, що кодує РНК, яка забезпечує боротьбу з нематодою або комахами-шкідниками, тощо.

Такі гени зокрема описані в опублікованих Заявках на Патент WO 91/02071, і WO95/06128 та Патентах США 7,923,602 та опублікованій Заявці на Патент США № 20100166723, кожна з яких включена тут у їх повному обсязі шляхом посилання.

Серед послідовностей ДНК, які кодують білки, що надають стійкості до деяких гербіцидів трансформованим рослинним клітинам або рослинам, слід згадати ген *bar* або *PAT* ген або ген *Streptomyces coelicolor*, описані в WO2009/152359, які надають стійкості до гербіцидів глюфосинатів, ген, який кодує прийнятний EPSPS, який надає стійкості до гербіцидів, для яких EPSPS є мішенню, таких як гліфосат та його солі (US 4,535,060, US 4,769,061, US 5,094,945, US 4,940,835, US 5,188,642, US 4,971,908, US 5,145,783, US 5,310,667, US 5,312,910, US 5,627,061, US 5,633,435), ген, який кодує гліфосат-п-ацетилтрансферазу (наприклад, US 8,222,489, US 8,088,972, US 8,044,261, US 8,021,857, US 8,008,547, US 7,999,152, US 7,998,703, US 7,863,503, US 7,714,188, US 7,709,702, US 7,666,644, US 7,666,643, US 7,531,339, US 7,527,955, та US 7,405,074), або ген, який кодує гліфосатоксидоредуктазу (наприклад, US 5,463,175).

Серед послідовностей ДНК, що кодують прийнятний EPSPS, який надає стійкості до гербіцидів, що мають EPSPS як мішень, посилання більш конкретно має бути зроблено на ген, що кодує рослинний EPSPS, зокрема, EPSPS кукурудзи, зокрема EPSPS кукурудзи, який включає дві мутації, зокрема, мутацію в амінокислотному положенні 102 і мутацію в амінокислотному положенні 106 (WO 2004/074443), і який описаний в Заявці на Патент США 6566587, далі названий як подвійний мутант кукурудзи EPSPS або 2mEPSPS, або ген, який кодує EPSPS, виділений з *Agrobacterium* і який описується послідовністю ID №. 2 і послідовністю ID №. 3 Патенту США 5,633,435, названий також CP4.

Серед послідовностей ДНК, які кодують прийнятні EPSPS, що забезпечують стійкість до гербіцидів, що мають EPSPS як мішень, посилання більш конкретно має бути зроблено на ген, що кодує EPSPS GRG23 з *Arthrobacter globiformis*, за винятком мутантів GRG23 ACE1, GRG23 ACE2 або GRG23 ACE3, зокрема мутантів або варіантів GRG23, описаних в WO2008/100353, таких як [GRG23\(ace3\)R173K](#) в послідовності SEQ ID №. 29 в WO2008/100353.

У випадку послідовностей ДНК, що кодують EPSPS, і більш конкретно, кодують вищезазначені гени, послідовності, яка кодує ці ферменти, передують послідовність, що кодує транзитний пептид, зокрема "оптимізований транзитний пептид", описаний в Патенті США 5,510,471 або 5,633,448.

Типові характерні особливості стійкості до гербіцидів, які можуть комбінуватись з послідовністю нуклеїнової кислоти винаходу, додатково включають щонайменше один інгібітор ALS (ацетолактатсинтази) (WO 2007/024782); мутований ген ALS/AHAS у *Arabidopsis* (Патент США 6,855,533); гени, що кодують 2,4-D-монооксигеназу, що надає стійкості до 2,4-D (2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти) в результаті метаболізації (Патент США 6,153,401); і, гени, які кодують Дикамба-монооксигенази, що визначають стійкість до Дикамби (3,6-дихлоро-2-метоксибензойної кислоти) внаслідок метаболізації (США 2008/0119361, і США 2008/0120739).

У різних втіленнях, HPPD винаходу "складається" з одним або більше генами толерантності, включаючи один або більше генів толерантності до гербіцидів – HPPD інгібіторів, та/або один або більше генів толерантності до гліфосату та/або глюфосинату. В одному втіленні, HPPD винаходу комбінується з генами 2mEPSPS та *bar*.

Серед послідовностей ДНК, що кодують білки, які забезпечують властивості стійкості до комах, на особливу увагу заслуговують білки Bt, широко описані в літературі і добре відомі досвідченим фахівцям у галузі. На увагу також заслуговують білки, екстраговані з бактерій, таких як *Photobacterium* (WO 97/17432 & WO 98/08932).

Серед таких послідовностей ДНК, що кодують білки винаходу, які надають нових властивостей стійкості до комах, більш конкретно слід згадати Bt Cry або VIP білки, широко описані в літературі та добре відомі фахівцям з досвідом роботи у галузі. Вони включають Cry1F білок або гібридні білки, які походять від Cry1F білка (напр., гібридні білки Cry1A-Cry1F, описані в US 6,326,169; US 6,281,016; US 6,218,188, або їх токсичні фрагменти), білки Cry1A-типу або їх токсичні фрагменти, переважно Cry1Ac білок або гібриди, які походять від Cry1Ac білка (напр., гібридний Cry1Ab-Cry1Ac білок, описаний в US 5,880,275) або Cry1Ab чи Bt2 білок або його інсектицидні фрагменти, описані в EP451878, Cry2Ae, Cry2Af або Cry2Ag білки, описані в WO02/057664 або їх токсичні фрагменти, Cry1A.105 білок, описаний в WO 2007/140256 (SEQ ID №. 7) чи їх токсичні фрагменти, VIP3Aa19 білок з NCBI інвентарним номером ABG20428, VIP3Aa20 білок з NCBI інвентарним номером ABG20429 (SEQ ID №. 2 в WO 2007/142840), VIP3A білки, що продукуються в бавовнику у подіях COT202 COT203 (WO 2005/054479 і WO 2005/054480, відповідно), Cry білки, описані в WO01/47952, VIP3Aa білок або його токсичний фрагмент, описаний Estruch et al. (1996), Proc Natl Acad Sci USA. 28;93(11):5389-94 та US 6,291,156, інсектицидні білки із *Xenorhabdus* (як описано в WO98/50427), *Serratia* (зокрема, з *S. entomophila*) або штамів видів *Photorhabdus*, таких як Tc-білки з *Photorhabdus*, як описано в WO98/08932 (напр., Waterfield et al., 2001, Appl Environ Microbiol. 67(11):5017-24; Ffrench-Constant and Bowen, 2000, Cell Mol Life Sci.; 57(5):828-33). Тут також включений будь-який варіант або мутант будь-якого з цих білків, які відрізняються декількома (1-10, переважно 1-5) амінокислотами з будь-якої з вищезазначених послідовностей, зокрема, з послідовності їх токсичного фрагмента, або які злиті з транзитним пептидом, таким як пластидний транзитний пептид або інший білок чи пептид.

В різних втіленнях, послідовність HPPD винаходу може бути комбінована в рослинах з одним або більше генами, які нестять бажані властивості, такі як толерантність до гербіцидів, толерантність до комах, стійкість до посухи, боротьби з нематодою, ефективність використання води, ефективність використання азоту, підвищене харчове значення, резистентність до захворювань, підвищений фотосинтез, підвищена якість волокна, толерантність до стресу, покращене розмноження тощо.

Особливо корисні події генетичної трансформації, які можна комбінувати з генами цього винаходу у рослинах того ж виду (напр., шляхом схрещування або ретрансформації рослини, що містить іншу подію генетичної трансформації, за допомогою химерного гена винаходу), включають Подію 531/PV-GHVK04 (бавовник, боротьба з комахами-шкідниками, описана в WO2002/040677), Подію 1143-14A (бавовник, боротьба з комахами-шкідниками, не депонована, описана в WO 06/128569); Подію 1143-51B (бавовник, боротьба з комахами-шкідниками, не депонована, описана в WO 06/128570); Подію 1445 (бавовник, толерантність до гербіцидів, не депонована, описана в US-A 2002-120964 або WO 02/034946 Подію 17053 (рис, толерантність до гербіцидів депонована як PTA-9843, описана в WO 10/117737); Подію 17314 (рис, толерантність до гербіцидів, депонована як PTA-9844, описана в WO 10/117735); Подію 281-24-236 (бавовник, боротьба з комахами-шкідниками - толерантність до гербіцидів, депонована як PTA-6233, описана в WO 05/103266 або US-A 2005-216969); Подію 3006-210-23 (бавовник, боротьба з комахами-шкідниками, толерантність до гербіцидів, депонована як PTA-6233, описана в US-A 2007-143876 або WO 05/103266); Подію 3272 (кукурудза, кількісна характеристика, депонована як PTA-9972, описана в WO 06/098952 або US-A 2006-230473); Подію 33391 (пшениця, толерантність до гербіцидів, депонована як PTA-2347, описана в WO2002/027004), Подію 40416 (кукурудза, боротьба з комахами-шкідниками, толерантність до гербіцидів, депонована як ATCC PTA-11508, описана в WO 11/075593); Подію 43A47 (кукурудза, боротьба з комахами-шкідниками - толерантність до гербіцидів, депонована як ATCC PTA-11509, описана в WO 11/075595); Подію 5307 (кукурудза, боротьба з комахами-шкідниками, депонована як ATCC PTA-9561, описана в WO 10/077816); Подію ASR-368 (польовиця, толерантність до гербіцидів, депонована як ATCC PTA-4816, описана в US-A 2006-162007 або WO 04/053062); Подію B16 (кукурудза, толерантність до гербіцидів, не депонована, описана в US-A 2003-126634); Подію BPS-CV127-9 (соя, толерантність до гербіцидів, депонована як NCIMB № 41603, описана в WO 10/080829); Подію BLR1 (олійний ріпак, відновлення чоловічої стерильності, депонована як NCIMB 41193, описана в WO2005/074671), Подію CE43-67B (бавовник, боротьба з комахами-шкідниками, депонована як DSM ACC2724, описана в US-A 2009-217423 або WO 06/128573); Подію CE44-69D (бавовник, боротьба з комахами-шкідниками, не депонована, описана в US-A 2010-0024077); Подію CE44-69D (бавовник, боротьба з комахами-шкідниками, не депонована, описана в WO 06/128571); Подію CE46-02A (бавовник, боротьба з комахами-шкідниками, не депонована, описана в WO 06/128572); Подію COT102 (бавовник, боротьба з комахами-шкідниками, не депонована, описана в US-A 2006-130175 або

WO 04/039986); Подію COT202 (бавовник, боротьба з комахами-шкідниками, не депонована, описана в US-A 2007-067868 або WO 05/054479); Подію COT203 (бавовник, боротьба з комахами-шкідниками, не депонована, описана в WO 05/054480);); Подію DAS21606-3 / 1606 (соє, толерантність до гербіцидів, депонована як РТА-11028, описана в WO2012/033794), Подію DAS40278 (кукурудза, толерантність до гербіцидів, депонована як АТСС РТА-10244, описана в WO 11/022469); Подію DAS-44406-6 / pDAB8264.44.06.1 (соє, толерантність до гербіцидів, депонована як РТА-11336, описана в WO2012/075426), Подію DAS-14536-7 /pDAB8291.45.36.2 (соє, толерантність до гербіцидів, депонована як РТА-11335, описана в WO2012/075429), Подію DAS-59122-7 (кукурудза, боротьба з комахами-шкідниками - толерантність до гербіцидів, депонована як АТСС РТА 11384, описана в US-A 2006-070139); Подію DAS-59132 (кукурудза, боротьба з комахами-шкідниками - толерантність до гербіцидів, не депонована, описана в WO 09/100188); Подію DAS68416 (соє, толерантність до гербіцидів, депонована як АТСС РТА-10442, описана в WO 11/066384 або WO 11/066360); Подію DP-098140-6 (кукурудза, толерантність до гербіцидів, депонована як АТСС РТА-8296, описана в US-A 2009-137395 або WO 08/112019); Подію DP-305423-1 (соє, кількісна характеристика, не депонована, описана в US-A 2008-312082 або WO 08/054747); Подію DP-32138-1 (кукурудза, система гібридизації, депонована як АТСС РТА-9158, описана в US-A 2009-0210970 або WO 09/103049); Подію DP-356043-5 (соє, толерантність до гербіцидів, депонована як АТСС РТА-8287, описана в US-A 2010-0184079 або WO 08/002872); Подію EE-1 (баклажан, боротьба з комахами-шкідниками, не депонована, описана в WO 07/091277); Подію FI117 (кукурудза, толерантність до гербіцидів, депонована як АТСС 209031, описана в US-A 2006-059581 або WO 98/044140); Подію FG72 (соє, толерантність до гербіцидів, депонована як РТА-11041, описана в WO2011/063413), Подію GA21 (кукурудза, толерантність до гербіцидів, депонована як АТСС 209033, описана в US-A 2005-086719 або WO 98/044140); Подію GG25 (кукурудза, толерантність до гербіцидів, депонована як АТСС 209032, описана в US-A 2005-188434 або WO 98/044140); Подію GHB119 (бавовник, боротьба з комахами-шкідниками - толерантність до гербіцидів, депонована як АТСС РТА-8398, описана в WO 08/151780); Подію GHB614 (бавовник, толерантність до гербіцидів, депонована як АТСС РТА-6878, описана в US-A 2010-050282 або WO 07/017186); Подію GJ11 (кукурудза, толерантність до гербіцидів, депонована як АТСС 209030, описана в US-A 2005-188434 або WO 98/044140); Подію GM RZ13 (цукровий буряк, резистентність до вірусів, депонована як NCIMB-41601, описана в WO 10/076212); Подію H7-1 (цукровий буряк, толерантність до гербіцидів, депонована як NCIMB 41158 або NCIMB 41159, описана в US-A 2004-172669 або WO 04/074492); Подію JOPLIN1 (пшениця, стійкість до захворювань, не депонована, описана в US-A 2008-064032); Подію LL27 (соє, толерантність до гербіцидів, депонована як NCIMB41658, описана в WO 06/108674 або US-A 2008-320616); Подію LL55 (соє, толерантність до гербіцидів, депонована як NCIMB 41660, описана в WO 06/108675 або US-A 2008-196127); Подію LLcotton25 (бавовник, толерантність до гербіцидів, депонована як АТСС РТА-3343, описана в WO 03/013224 або US-A 2003-097687); Подію LLRICE06 (рис, толерантність до гербіцидів, депонована як АТСС 203353, описана в US 6,468,747 або WO 00/026345); Подію LLRICE62 (рис, толерантність до гербіцидів, депонована як АТСС 203352, описана в WO2000/026345), Подію LLRICE601 (рис, толерантність до гербіцидів, депонована як АТСС РТА-2600, описана в US-A 2008-2289060 або WO 00/026356); Подію LY038 (кукурудза, кількісна характеристика, депонована як АТСС РТА-5623, описана в US-A 2007-028322 або WO 05/061720); Подію MIR162 (кукурудза, боротьба з комахами-шкідниками, депонована як РТА-8166, описана в US-A 2009-300784 або WO 07/142840); Подію MIR604 (кукурудза, боротьба з комахами-шкідниками, не депонована, описана в US-A 2008-167456 або WO 05/103301); Подію MON15985 (бавовник, боротьба з комахами-шкідниками, депонована як АТСС РТА-2516, описана в US-A 2004-250317 або WO 02/100163); Подію MON810 (кукурудза, боротьба з комахами-шкідниками, не депонована, описана в US-A 2002-102582); Подію MON863 (кукурудза, боротьба з комахами-шкідниками, депонована як АТСС РТА-2605, описана в WO 04/011601 або US-A 2006-095986); Подію MON87427 (кукурудза, контроль запилення, депонована як АТСС РТА-7899, описана в WO 11/062904); Подію MON87460 (кукурудза, стресотолерантність, депонована як АТСС РТА-8910, описана в WO 09/111263 або US-A 2011-0138504); Подію MON87701 (соє, боротьба з комахами-шкідниками, депонована як АТСС РТА-8194, описана в US-A 2009-130071 або WO 09/064652); Подію MON87705 (соє, кількісна характеристика - толерантність до гербіцидів, депонована як АТСС РТА-9241, описана в S-A 2010-0080887 або WO 10/037016); Подію MON87708 (соє, толерантність до гербіцидів, депонована як АТСС РТА-9670, описана в WO 11/034704); Подію MON87712 (соє, врожайність, депонована як РТА-10296, описана в WO2012/051199), Подію MON87754 (соє, кількісна характеристика, депонована як АТСС РТА-9385, описана в WO 10/024976); Подію MON87769 (соє, кількісна характеристика,

депонована як ATCC PTA-8911, описана в US-A 2011-0067141 або WO 09/102873); Подію MON88017 (кукурудза, боротьба з комахами-шкідниками - толерантність до гербіцидів, депонована як ATCC PTA-5582, описана в US-A 2008-028482 або WO 05/059103); Подію MON88913 (бавовник, толерантність до гербіцидів, депонована як ATCC PTA-4854, описана в
 5 WO 04/072235 або US-A 2006-059590); Подію MON88302 (олійний ріпак, толерантність до гербіцидів, депонована як PTA-10955, описана в WO2011/153186), Подію MON88701 (бавовник, толерантність до гербіцидів, депонована як PTA-11754, описана в WO2012/134808), Подію MON89034 (кукурудза, боротьба з комахами-шкідниками, депонована як ATCC PTA-7455, описана в WO 07/140256 або US-A 2008-260932); Подію MON89788 (соя, толерантність до
 10 гербіцидів, депонована як ATCC PTA-6708, описана в US-A 2006-282915 або WO 06/130436); Подію MS11 (олійний ріпак, контроль запилення - толерантність до гербіцидів, депонована як ATCC PTA-850 або PTA-2485, описана в WO 01/031042); Подію MS8 (олійний ріпак, контроль запилення - толерантність до гербіцидів, депонована як ATCC PTA-730, описана в WO 01/041558 або US-A 2003-188347); Подію NK603 (кукурудза, толерантність до гербіцидів,
 15 депонована як ATCC PTA-2478, описана в US-A 2007-292854); Подію PE-7 (рис, боротьба з комахами-шкідниками, не депонована, описана в WO 08/114282); Подію RF3 (олійний ріпак, контроль запилення - толерантність до гербіцидів, депонована як ATCC PTA-730, описана в WO 01/041558 або US-A 2003-188347); Подію RT73 (олійний ріпак, толерантність до гербіцидів, не депонована, описана в WO 02/036831 або US-A 2008-070260); Подію SYHT0H2 / SYN-000H2-5
 20 (соя, толерантність до гербіцидів, депонована як PTA-11226, описана в WO2012/082548), Подію T227-1 (цукровий буряк, толерантність до гербіцидів, не депонована, описана в WO 02/44407 або US-A 2009-265817); Подію T25 (кукурудза, толерантність до гербіцидів, не депонована, описана в US-A 2001-029014 або WO 01/051654); Подію T304-40 (бавовник, боротьба з комахами-шкідниками - толерантність до гербіцидів, депонована як ATCC PTA-8171, описана в
 25 US-A 2010-077501 або WO 08/122406); Подію T342-142 (бавовник, боротьба з комахами-шкідниками, не депонована, описана в WO 06/128568); Подію TC1507 (кукурудза, боротьба з комахами-шкідниками - толерантність до гербіцидів, не депонована, описана в US-A 2005-039226 або WO 04/099447); Подію VIP1034 (кукурудза, боротьба з комахами-шкідниками - толерантність до гербіцидів, депонована як ATCC PTA-3925, описана в WO 03/052073), Подію 32316 (кукурудза, боротьба з комахами-шкідниками - толерантність до гербіцидів, депонована як PTA-11507, описана в WO 11/084632), Подію 4114 (кукурудза, боротьба з комахами-шкідниками - толерантність до гербіцидів, депонована як PTA-11506, описана в WO 11/084621),
 30 Подію EE-GM3 / FG72 (соя, толерантність до гербіцидів, ATCC Інвентарний № PTA-11041, WO2011/063413A2), Подію DAS-68416-4 (соя, толерантність до гербіцидів, ATCC Інвентарний № PTA-10442, WO2011/066360A1), Подію DAS-68416-4 (соя, толерантність до гербіцидів, ATCC Інвентарний № PTA-10442, WO2011/066384A1), подію DP-040416-8 (кукурудза, боротьба з комахами-шкідниками, ATCC Інвентарний № PTA-11508, WO2011/075593A1), подію DP-043A47-3 (кукурудза, боротьба з комахами-шкідниками, ATCC Інвентарний № PTA-11509, WO2011/075595A1), подію DP-004114-3 (кукурудза, боротьба з комахами-шкідниками, ATCC
 40 Інвентарний № PTA-11506, WO2011/084621A1), подію DP-032316-8 (кукурудза, боротьба з комахами-шкідниками, ATCC Інвентарний № PTA-11507, WO2011/084632A1), подію MON-88302-9 (олійний ріпак, толерантність до гербіцидів, ATCC Інвентарний № PTA-10955, WO2011/153186A1), подію DAS-21606-3 (соя, толерантність до гербіцидів, ATCC Інвентарний № PTA-11028, WO2012/033794A2), подію MON-87712-4 (соя, кількісна характеристика, ATCC Інвентарний № PTA-10296, WO2012/051199A2), подію DAS-44406-6 (соя, "пакетована" толерантність до гербіцидів, ATCC Інвентарний № PTA-11336, WO2012/075426A1), подію DAS-14536-7 (соя, "пакетована" толерантність до гербіцидів, ATCC Інвентарний № PTA-11335, WO2012/075429A1), подію SYN-000H2-5 (соя, толерантність до гербіцидів, ATCC Інвентарний № PTA-11226, WO2012/082548A2), подію DP-061061-7 (олійний ріпак, толерантність до
 50 гербіцидів, № депозиту відсутній, WO2012071039A1), подію DP-073496-4 (олійний ріпак, толерантність до гербіцидів, № депозиту відсутній, US2012131692), подію 8264.44.06.1 (соя, "пакетована" толерантність до гербіцидів, Інвентарний № PTA-11336, WO2012075426A2), подію 8291.45.36.2 (соя, "пакетована" толерантність до гербіцидів, Інвентарний № PTA-11335, WO2012075429A2), подію SYHT0H2 (соя, ATCC Інвентарний № PTA-11226, WO2012/082548A2), подію MON88701 (бавовник, ATCC Інвентарний № PTA-11754, WO2012/134808A1), подію KK179-2 (люцерна, ATCC Інвентарний № PTA-11833, WO2013003558A1), подію rDAB8264.42.32.1 (соя, "пакетована" толерантність до гербіцидів, ATCC Інвентарний № PTA-11993, WO2013010094A1), подію MZDT09Y (кукурудза, ATCC Інвентарний № PTA-13025, WO2013012775A1).
 60 Е. Полінуклеотидні конструкції

Полінуклеотиди, які кодують HPPD поліпептиди цього винаходу, можуть бути модифіковані отриманням або посиленням експресії в рослинних клітинах. Полінуклеотиди, які кодують ідентифіковані тут поліпептиди, можуть бути забезпечені в експресійних касетах для експресії в рослині, яка становить інтерес. "Касета для експресії в рослині" включає конструкцію ДНК, включаючи конструкцію рекомбінантної ДНК, яка здатна призводити до експресії полінуклеотида в клітині. Касета може включати в 5'-3' напрямку транскрипції, ділянку ініціації транскрипції (тобто, промотор, зокрема, гетерологічний промотор), функціонально зв'язану з одним або більше полінуклеотидами винаходу, та/або ділянку термінації транскрипції і трансляції (тобто, ділянку термінації), функціональну в рослинах. Касета додатково може містити щонайменше один додатковий полінуклеотид для введення в організм, такий як ген маркера селекції. Альтернативно, додатковий полінуклеотид (и) може бути забезпечений в декількох касетах для експресії. Така експресійна касета забезпечується з багатьма рестрикційними сайтами для інсерції полінуклеотида (ів) під транскрипційною регуляцією регуляторних ділянок.

У наступному втіленні цей винахід стосується химерного гена, який включає кодуючу послідовність, що містить гетерологічну нуклеїнову кислоту винаходу, функціонально зв'язану з промотором, який експресується в рослині, та необов'язково з ділянкою термінації транскрипції та поліаденилювання. "Гетерологічний", як правило, стосується полінуклеотиду або поліпептиду, який не є ендегенним для клітини або не є ендегенним стосовно локалізації нативного геному, в якому він присутній, і додавався до клітини шляхом інфекції, трансфекції, мікроін'єкції, електропорації, мікропроекції тощо. Під "функціонально зв'язаний" розуміють функціональний зв'язок між двома полінуклеотидами. Наприклад, якщо промотор функціонально зв'язується з послідовністю ДНК, промоторна послідовність ініціює та скеровує транскрипцію послідовності ДНК. Було з'ясовано, що функціонально зв'язані полінуклеотиди можуть бути суміжними або ні, при посиленні на з'єднання двох ділянок кодуючих поліпептидів, поліпептиди експресуються в тій же рамці читування.

Промотором може бути будь-яка полінуклеотидна послідовність, яка виявляє транскрипційну активність в обраних рослинних клітинах, частинах рослин або рослинах. Промотор може бути нативним або аналогічним, чи чужорідним або гетерологічним щодо рослини-господаря та/або послідовності ДНК винаходу. Якщо промотор є "нативним" або "аналогічним" щодо клітини-господаря, це означає, що промотор виявлений у природній рослині, в яку промотор вводиться. Якщо промотор є "чужорідний" або "гетерологічний" стосовно послідовності ДНК винаходу, це означає, що промотор не є природним або таким, що трапляється у природі промотором, для функціонально зв'язаних послідовностей ДНК винаходу. Промотори можуть бути індукційними або конститутивними. Вони можуть бути природними, можуть складатись із частин різних промоторів, які зустрічаються у природі, або можуть бути частково або повністю синтетичними. Інструкція для конструювання промоторів забезпечується дослідженнями структури промоторів, такими як Harley and Reynolds (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:2343-2361. Положення промотора може також бути оптимізоване по відношенню до сайту ініціації транскрипції. Див., напр., Roberts et al. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:760-764. Багато прийнятних промоторів для використання у рослинах є добре відомі з рівня техніки у галузі.

Наприклад, прийнятні конститутивні промотори для використання у рослинах включають: промотори від вірусів рослин, такі як промотор каулімовірусу хлоротичної строкатості арахісу (PCISV) (U.S. Pat. No. 5,850,019); 35S промотор з вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV) (Odell et al. (1985) *Nature* 313:810-812); промотори генів метилтрансферази вірусу *Chlorella* (U.S. Pat. No. 5,563,328) та повний (непроцесований) промотор транскрипції вірусу мозаїки ранника (FMV) (U.S. Pat. No. 5,378,619); промотори з таких генів, як ген актину рису (McElroy et al. (1990) *Plant Cell* 2:163-171, і Патент США 5,641,876); убіквітину (Christensen et al. (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:619-632 and Christensen et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675-689); pEMU (Last et al. (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81:581-588); MAS (Velten et al. (1984) *EMBO J.* 3:2723-2730 і Патент США 5,510,474); гістону H3 кукурудзи (Lepetit et al. (1992) *Mol. Gen. Genet.* 231:276-285 і Atanassova et al. (1992) *Plant J.* 2(3):291-300); *Brassica napus* ALS3 (PCT application WO 97/41228); гену малої субодиниці рибулозо-біфосфаткарбоксилази/оксигенази (RuBisCO); цирковірусу (AU 689 311) або вірусу мозаїки жилок маніока (касави) (CsVMV, US 7,053,205); і промотори різних генів *Agrobacterium* (див. Патенти США №№ 4,771,002; 5,102,796; 5,182,200; and 5,428,147).

Прийнятні індукційні промотори для використання у рослинах включають: промотор з ACE1 системи, системи, що реагує на мідь (Mett et al. (1993) *PNAS* 90:4567-4571); промотор гена In2 кукурудзи, який реагує на сафенери до бензол-сульфонамідного гербіциду (Hershey et al. (1991) *Mol. Gen. Genetics* 227:229-237 and Gatz et al. (1994) *Mol. Gen. Genetics* 243:32-38); та промотор Tet-репресора з Tn10 (Gatz et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227:229-237). Інший

індуцибельний промотор для використання у рослинах – це промотор, який відповідає на індукуючий чинник, на який рослини зазвичай не реагують. Типовий індукцибельний промотор цього типу являє собою промотор гена стероїдного гормону, транскрипційна активність якого індукується глюкокортикостероїдним гормоном (Schena et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10421) або остання заявка на химерний активатор транскрипції, XVE, для використання в естроген-індуцибельній системі експресії в рослинах, яка активується естрадіолом (Zuo et al. (2000) Plant J., 24:265-273). Інші індукцибельні промотори для використання у рослинах описані в EP 332104, PCT WO 93/21334 та PCT WO 97/06269, які включені тут шляхом посилання у повному обсязі. Промотори складаються з частин інших промоторів; також можуть бути використані частково або повністю синтетичні промотори. Див. напр., Ni et al. (1995) Plant J. 7:661-676 та PCT WO 95/14098, які описують такі промотори для використання у рослинах.

В одному втіленні цього винаходу, послідовність промотора, специфічна для конкретних ділянок або тканин рослин, може бути використана для експресії HPPD білків винаходу, таких як промотори, специфічні для насіння (Datla, R. et al., 1997, Biotechnology Ann. Rev. 3, 269-296), насамперед промотор гена напіву (EP 255 378 A1), промотор гена фазеоліну, промотор гена глютеніну, промотор гена геліантину (WO 92/17580), промотор гена альбуміну (WO 98/45460), промотор гена олеосину (WO 98/45461), SAT1 промотор або SAT3 промотор (PCT/US98/06978).

Також може бути використаний індукцибельний промотор, переважно обраний з фенілаланін-амоній-ліази (PAL), HMG-CoA редуктази (HMG), хітинази, глюканази, інгібітора протеїнази (PI), гена родини PR1, нопалінсинтази (nos) та vspB промоторів (US 5 670 349, Таблиця 3), HMG2 промотора (US 5 670 349), промотор бета-галактозидази яблука (ABG1) та промотор аміноциклопан-карбоксилат-синтази яблука (ACC синтази) (WO 98/45445). Численні промотори можуть бути використані в конструкціях винаходу, включаючи їх розташування у певній послідовності (підряд).

Промотори можуть включати або бути модифіковані включенням одного або більше енхансерних елементів. У деяких втіленнях, промотор може включати багато енхансерних елементів. Промотори, які містять енхансерні елементи, забезпечують вищі рівні транскрипції у порівнянні з промоторами, які їх не включають. Прийнятні енхансерні елементи для використання у рослинах включають PCISV енхансерний елемент (Патент США № 5,850,019), CaMV 35S енхансерний елемент (Патент США №№ 5,106,739 і 5,164,316) і FMV енхансерний елемент (Maiti et al. (1997) Transgenic Res. 6:143-156); активатор трансляції вірусу мозаїки тютюну (TMV), описаний в Заявці WO 87/07644, або вірусу "гравірування" тютюну (TEV), описаний Carrington & Freed 1990, J. Virol. 64: 1590-1597, наприклад, або інтрони, такі як adh1 інтрон кукурудзи або інтрон 1 гену актину рису. Див. також PCT WO 96/23898, WO2012/021794, WO2012/021797, WO2011/084370 і WO2011/028914.

Часто такі конструкції можуть містити 5'- та 3' нетрансльовані ділянки. Такі конструкції можуть містити "сигнальну послідовність" або "лідерну послідовність", для того щоб сприяти котрансляційному або посттрансляційному транспорту пептиду винаходу до певних внутрішньоклітинних структур, таких як хлоропласт (чи інші пластиди), ендоплазматичний ретикулум, або апарат Гольджі, або забезпечити секрецію. Наприклад, конструкція може бути сконструйована таким чином, що включає сигнальний пептид, для того щоб сприяти перенесенню пептиду до ендоплазматичного ретикулуму. Під "сигнальною послідовністю" розуміють послідовність, що є відомою або, як очікується, такою, що призведе до котрансляційного або посттрансляційного пептидного транспорту через клітинну мембрану. В еукаріотів це типово включає секрецію в апарат Гольджі, тоді як у деяких випадках це призводить до глікозилювання. Під "лідерною послідовністю" розуміють будь-яку послідовність, що при трансляції призводить до утворення амінокислотної послідовності, достатньої для ініціації котрансляційного транспорту пептидного ланцюга до субклітинних органел. Таким чином, це включає лідерні послідовності, які ініціюють транспорт та/або глікозилювання шляхом перенесення в ендоплазматичний ретикулум, перенесення до вакуолей, пластид, включаючи хлоропласти, мітохондрії тощо. Більш бажаним було сконструювати рослинну експресійну касету, яка містить інтрон, такий як мРНК, процесинг інтрона потрібний для експресії.

Під "3'-нетрансльованою ділянкою" розуміють полінуклеотид, розташований нижче рамки зчитування кодуєчої послідовності ("даунстрім"). Сигнальні послідовності поліаденілювання та інші послідовності, які кодують регуляторні сигнальні послідовності, здатні впливати на сигнальні послідовності поліаденілювання та інші послідовності, які кодують регуляторні сигнальні послідовності, здатні впливати на додавання частин поліаденілової кислоти до 3'-кінців прекурсора мРНК, являють собою 3'-нетрансльовані ділянки. Під "5' нетрансльованою ділянкою" розуміють полінуклеотид, розташований вище рамки зчитування кодуєчої послідовності ("апстрім").

Інші "апстрім" або "даунстрім" нетрансльовані елементи включають енхансери. Енхансери – це полінуклеотиди, які діють для того, щоб підвищити експресію промоторної ділянки. Енхансери добре відомі в галузі та включають, але не обмежені ними, енхансерну ділянку SV40 та енхансерний елемент 35S.

Ділянка термінації транскрипції може бути нативною з ділянкою ініціації транскрипції, може бути нативною з послідовністю цього винаходу, або може бути похідною з іншого джерела. Традиційно ділянки термінації є доступними з Ті-плазмід *A. tumefaciens*, таких як ділянки термінації октопінсинтази або нопалінсинтази. Див. також Guerineau et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262:141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64:671-674; Sanfacon et al. (1991) *Genes Dev.* 5:141-149; Mogen et al. (1990) *Plant Cell* 2:1261-1272; Munroe et al. (1990) *Gene* 91:151-158; Ballas et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7891-7903; Joshi et al. (1987) *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639; та Європейську Заявку на Патент EP 0 633 317 A1.

В одному втіленні винаходу, синтетичні послідовності ДНК створюються для заданого поліпептиду, такого як поліпептиди винаходу. Експресія відкритої рамки зчитування синтетичної послідовності ДНК в клітині призводить до утворення поліпептиду винаходу. Синтетичні послідовності ДНК можуть використовуватись для простого видалення небажаних сайтів ендонуклеазної рестрикції, для того щоб сприяти стратегії клонування ДНК, для того щоб змінювати чи видаляти будь-який потенційний кодон bias, змінювати або покращувати вміст GC, видаляти або змінювати альтернативні рамки зчитування, та/або змінювати або видаляти інтрон /екзон сплайсингу сайтів розпізнавання, сайти поліаденілювання, послідовності Шайн-Далгарно, небажані елементи промотора, і т.п., які можуть бути присутні в нативній послідовності ДНК. Також можливо, що синтетичні послідовності ДНК можуть бути використані для введення інших покращень в послідовність ДНК, таких як введення інтрону, створення послідовності ДНК, яка експресується як білок, злитий з цільовими послідовностями органел, такими як хлоропластні транзитні пептиди, цільові пептиди апопласту/вакуоль або пептидні послідовності, які призводять до утримання отриманого пептиду в ендоплазматичному ретикулумі. Синтетичні гени можуть також бути синтезовані за допомогою кодонів, які надають преференції певному типу клітин-господарів для покращеної експресії або можуть бути синтезовані з використанням кодонів з частотою використання кодонів, які надають преференції певному типу клітин-господарів. Див., наприклад, Campbell and Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92:1-11; Патент США №№ 6,320,100; 6,075,185; 5,380,831; and 5,436,391, опубліковані заявки на Патент США №№ 20040005600 та 20010003849, та Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498, включені тут у вигляді посилань.

В одному втіленні, полінуклеотиди, які становлять інтерес, скеровуються до хлоропласту для експресії. У такий спосіб, коли полінуклеотид винаходу безпосередньо не вставляється у хлоропласт, експресійна касета додатково має містити полінуклеотид, який кодує транзитний пептид для спрямування цільового нуклеотиду до хлоропластів. Такі транзитні пептиди відомі в галузі з рівня техніки. Див., наприклад, 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; і Shah et al. (1986) *Science* 233:478-481.

Полінуклеотиди, які становлять інтерес, для доставки до хлоропластів, можуть бути оптимізовані для експресії в хлоропластах, для того щоб врахувати відмінності у використанні кодону між ядром рослини та цими органелами. У такий спосіб полінуклеотиди, які становлять інтерес, можуть бути синтезовані за допомогою кодонів хлоропластів. Див., наприклад, Патент США № 5,380,831, включений тут шляхом посилання.

Ця рослинна експресійна касета може бути вставлена у вектор для трансформації рослин. Під "вектором для трансформації" розуміють молекулу ДНК, яка робить можливою трансформацію клітини. Така молекула може складатись з однієї або більше експресійних касет, і може утворювати структуру більше ніж з однією молекулою векторної ДНК. Наприклад, бінарні вектори являють собою вектори для трансформації рослин, які використовують два несуміжні ДНК вектори, для того щоб кодувати всі необхідні цис- і трансактивуючі функції для трансформації рослинних клітин (Hellens and Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5:446-451). "Вектор" стосується полінуклеотидної конструкції, сконструйованої для перенесення між різними клітинами-господарями. "Експресуючий вектор" стосується вектора, який має здатність вбудовувати, інтегрувати та експресувати гетерологічні послідовності ДНК або їх фрагменти в чужорідну клітину.

Вектор для трансформації рослин включає один або більше ДНК векторів для здійснення трансформації рослин. Наприклад, це загальна практика в галузі – використання векторів для трансформації рослин, які включають більше, ніж один суміжний сегмент ДНК. У галузі ці

вектори часто називаються як бінарні вектори. Бінарні вектори, а також вектори з хелперними плазмідами найчастіше використовуються для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, де розмір та складність сегментів ДНК, які потрібні для досягнення ефективної трансформації, сегменти ДНК, потрібні для досягнення ефективної трансформації, є досить великими, тому має переваги розділення функцій між окремими молекулами ДНК. Бінарні вектори, як правило, містять плазмідний вектор, який містить *cis*-активні послідовності, потрібні для перенесення Т-ДНК (таких як лівосторонні і правосторонні), селективний маркер, який конструюється, для того щоб бути здатним для експресії в рослинній клітині, та "полінуклеотид винаходу" (полінуклеотид, сконструйований для експресії в рослинній клітині, для якої бажана генерація (розмноження) трансгенних рослин). Також у цьому плазмідному векторі присутні послідовності, потрібні для бактеріальної реплікації. *Cis*-активні послідовності розташовані у спосіб, який робить можливим ефективне перенесення в рослинні клітини та експресію в них. Наприклад, послідовність селективного маркера та послідовність винаходу локалізуються між лівим та правим краями. Часто другий плазмідний вектор містить трансактивуючі чинники, які опосередковують перенесення Т-ДНК від *Agrobacterium* до рослинних клітин. Ця плазміда часто несе вірулентні функції (*Vir* гени), які дозволяють інфікування рослинних клітин *Agrobacterium*, і перенесення ДНК за допомогою розщеплення в крайніх послідовностях та *vir*-опосередковане перенесення ДНК, як зрозуміло з рівня техніки (Hellens and Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science*, 5:446-451).

Для трансформації рослин можуть бути використані декілька типів штамів *Agrobacterium* (напр., LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105, тощо). Другий плазмідний вектор не є необхідним для введення полінуклеотидів в рослини за допомогою інших способів, таких як мікроін'єкція, мікропроекція, електропорація, поліетиленгліколь-опосередкована трансформація, тощо.

1.1 F. Трансформація рослин

Способи винаходу стосуються введення нуклеотидної конструкції в рослину. Під "введенням" розуміють надання рослині нуклеотидної конструкції у такий спосіб, що конструкція отримує доступ до внутрішньої частини рослинної клітини. Способи винаходу не потребують використання конкретного способу введення рослині нуклеотидної конструкції, лише якщо нуклеотидна конструкція отримує доступ до внутрішньої частини щонайменше однієї клітини рослини. Способи введення нуклеотидних конструкцій в рослини відомі в галузі техніки, включаючи, але не обмежуючись, способи стабільної трансформації, способи тимчасової трансформації та вірус-опосередковані способи.

Див., наприклад, способи для трансформації рослинних клітин та регенерації рослин, описані в: US 4,459,355, US 4,536,475, US 5,464,763, US 5,177,010, US 5,187,073, EP 267,159 A1, EP 604 662 A1, EP 672 752 A1, US 4,945,050, US 5,036,006, US 5,100,792, US 5,371,014, US 5,478,744, US 5,179,022, US 5,565,346, US 5,484,956, US 5,508,468, US 5,538,877, US 5,554,798, US 5,489,520, US 5,510,318, US 5,204,253, US 5,405,765, EP 442 174 A1, EP 486 233 A1, EP 486 234 A1, EP 539 563 A1, EP 674 725 A1, WO 91/02071, WO 95/06128, та WO2011/095460, кожен з яких включений тут шляхом посилання, зокрема, стосовно методів трансформації, описаних тут.

Загалом, способи трансформації рослин передбачають перенесення гетерологічної ДНК в рослинні клітини-мішені (напр., незрілі та зрілі зародки, суспензійні культури, недиференційований калус, протопласти тощо), після чого за допомогою застосування максимального порогового рівня прийнятної селекції (залежно від гена-маркера селекції) відновлюють трансформовані рослинні клітини з нетрансформованої клітинної маси. Експланти, як правило, переносяться на свіжу порцію того ж середовища і культивуються звичайним способом. Внаслідок цього трансформовані рослини диференціюють пагони після перенесення на середовище для регенерації, доповнене максимальним пороговим рівнем селективної речовини. Пагони після цього переносять на селективне середовище для укорінення для отримання укорінених пагонів чи рослинки. Трансгенні рослини після цього виростають у дорослі рослини і дають фертильне насіння (e.g. Hiei et al. (1994) *The Plant Journal* 6:271-282; Ishida et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750). Експланти, як правило, переносяться на свіжу порцію того ж самого середовища і культивуються, як належить. Загальний опис методик та способів для генерування трансгенних рослин наведено у Ayres and Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13:219-239 та Bommineni and Jauhar (1997) *Maydica* 42:107-120. Оскільки трансформований матеріал містить багато клітин; як трансформовані, так і нетрансформовані клітини присутні в кожному шматочку калюсу або тканини чи групи клітин. Здатність знищувати нетрансформовані клітини та дозволяти трансформованим клітинам проліферувати призводить до створення культури трансформованої рослини.

Часто здатність видаляти нетрансформовані клітини становить обмеження для швидкого

виділення трансформованих клітин та успішного розмноження трансгенних рослин. Молекулярні та біохімічні методи можуть бути використані для підтвердження присутності інтегрованого гетерологічного гена винаходу у геном трансгенної рослини.

Отримання трансгенних рослин може бути здійснене за допомогою одного з декількох методів, включаючи, але не обмежуючись ними, введення гетерологічної ДНК з використанням *Agrobacterium* в рослинні клітини (*Agrobacterium*-опосередкована трансформація), бомбардування рослинних клітин гетерологічною чужорідною ДНК, прикріпленою до часточок, та різних інших методів, не опосередкованих перенесенням чужорідної ДНК з часточками (напр., Hiei et al. (1994) *The Plant Journal* 6:271-282; Ishida et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750; Ayres and Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13:219-239; Bommineni and Jauhar (1997) *Maydica* 42:107-120).

Способи трансформації хлоропластів відомі в галузі. Див., наприклад, 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. Спосіб оснований на доставці за допомогою генної пушки ДНК, що містить селективний маркер, і цільової ДНК у пластидний геном через гомологічну рекомбінацію. Крім того, пластидна трансформація може бути здійснена шляхом трансактивації мовчазного пластидного трансгена за допомогою тканинної експресії закодованої в ядрі та пластидної РНК-полімерази. Така система викладена в McBride et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7301-7305.

Із трансформованих клітин можуть бути вирощені рослини згідно з традиційними методами. Див., наприклад, McCormick et al. (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Після цього такі рослини вирощуються і запилюються або пилом того ж трансформованого штаму, або пилом інших штамів, після чого ідентифікуються отримані гібриди, що мають конститутивну експресію бажаних фенотипових ознак. Два або більше поколінь можуть бути вирощені, для того щоб гарантувати, що експресія бажаної фенотипової ознаки стабільно підтримується та успадковується, і що здатність зібраного насіння забезпечувати експресію бажаної фенотипової ознаки підтримується. У такий спосіб, цей винахід забезпечує трансформоване насіння (також називається як "трансгенне насіння"), яке несе нуклеотидну конструкцію винаходу, наприклад, експресійну касету винаходу, стабільно вбудовану в його геном. У різних втіленнях, насіння може бути вкрите щонайменше одним фунгіцидом та/або щонайменше одним інсектицидом, щонайменше одним гербіцидом та/або щонайменше однією захисною речовиною або будь-якою їх комбінацією.

Г. Оцінка трансформації рослини

Після введення гетерологічної чужорідної ДНК в рослинні клітини, трансформація або інтеграція гетерологічного гена в рослинний геном підтверджується різними методами, такими як аналіз нуклеїнових кислот, білків та метаболітів, асоційованих з інтегрованим геном.

ПЛР-аналіз – це швидкий спосіб скринінгу трансформованих клітин, тканин або пагонів на присутність інкорпорованого гена на ранній стадії до висадки в ґрунт (Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)). ПЛР виконується за допомогою олігонуклеотидних праймерів, специфічних стосовно гена винаходу, або вектора на основі *Agrobacterium*, тощо.

Трансформація рослин може бути підтверджена на допомогою Саузерн-блот аналізу геномної ДНК (Sambrook and Russell (2001) *supra*). Загалом, тотальна ДНК екстрагується із трансформантів, розщеплюється за допомогою відповідних рестриктаз, фракціонується в агарозному гелі та переноситься на нітроцелюлозні або нейлонові мембрани. Мембрана або "блот" можуть після цього бути зондовані за допомогою, наприклад, радіоміченого ³²P фрагмента-мішені ДНК, для того щоб підтвердити інтеграцію введеного гена в геном рослини згідно зі стандартними методиками (Sambrook and Russell, 2001, *supra*).

При Нозерн-блоттингу РНК ізолюється зі специфічної тканини трансформанта, фракціонується в формальдегід-агарозному гелі і наноситься на нейлоновий фільтр згідно зі стандартними методиками, які широко застосовуються в галузі (Sambrook and Russell (2001) *supra*). Експресія РНК, закодованої нуклеотидними послідовностями винаходу, тестується шляхом гібридизації фільтра з радіоактивним зондом, що походить з GDC, за допомогою загальновідомих методів (Sambrook and Russell (2001) *supra*).

Вестерн-блоттинг, ELISA, тестування латерального потоку, біохімічні дослідження тощо можуть бути проведені на трансгенних рослинах, для того щоб виявити присутність білка, закодованого геном стійкості до гербіцидів з використанням стандартних методик (Sambrook and Russell (2001) *supra*), використовуючи антитіла, які зв'язуються з одним або більше епітопами, присутніми на білку стійкості до гербіциду.

В одному втіленні винаходу, гени HPPD, описані тут, використовуються як маркери для

оцінювання трансформації бактеріальних чи рослинних клітин.

Н. Використання маркера для трансформації

Винахід також пов'язаний з використанням у способах для трансформації рослин нуклеїнової кислоти, що кодує HPPD згідно з винаходом, як маркерного гена або як кодуючої послідовності, яка робить можливим надання рослині стійкості до гербіцидів, що є HPPD інгібіторами, і використання одного або більше HPPD інгібітора (ів) на рослинах, які включають нуклеїнову послідовність, що кодує HPPD згідно з винаходом. Див., наприклад, Патент США 6,791,014, який включений тут у його повному обсязі шляхом посилання.

У цьому втіленні HPPD інгібітор може бути введений в культуральне середовище компетентних рослинних клітин, для того щоб знебарвити вказані клітини перед етапом трансформації. Знебарвлені компетентні клітини після цього трансформуються за допомогою гена, що несе толерантність до HPPD інгібіторів, як селективного маркера, і трансформовані рослини, які інтегрували вказаний селекційний маркер у свій геном, стали зеленими, що сприяло їх відбору. Такий процес робить можливим зменшення часу, потрібного для відбору трансформованих рослин.

Таким чином, одне втілення цього винаходу включає спосіб для трансформації рослинних клітин за допомогою введення гетерологічного гена у вказані рослинні клітини з геном толерантності до HPPD інгібіторів як селективного маркера, де спосіб полягає в отриманні компетентних рослинних клітин, здатних отримувати гетерологічний ген у прийнятному середовищі та введенні прийнятної кількості HPPD інгібітора у прийнятне культуральне середовище компетентних рослинних клітин. Після цього компетентні клітини трансформуються за допомогою гетерологічного гена та селективного маркера, і трансформовані рослини, які містять гетерологічний ген, вирощуються на прийнятному середовищі, і з-поміж них відбираються трансформанти. Після цього з трансформованих рослин можуть бути регенеровані фертильні трансформовані рослини.

I. Рослини та частини рослин

Під терміном "рослина" розуміють цілі рослини, органи рослин (напр., листки, стебла, корені тощо), насіння, рослинні клітини, пропагули, зародки і їх потомство. Рослинні клітини можуть бути диференційовані або недиференційовані (напр., калус, суспензійна клітинна культура, протопласти, клітини листка, клітини кореня, флоємні клітини, пилки). Цей винахід може бути використаний для введення полінуклеотидів у будь-який вид, включаючи, але не обмежуючись ними, однодольні та дводольні. Приклади рослин винаходу включають, але не обмежені ними, кукурудзу (маїс), сорго, пшеницю, соняшник, помідори, хрестоцвіті, перці, картоплю, бавовник, рис, сою, цукрові буряки, цукрову тростину, тютюн, ячмінь та ріпак, Brassica sp., люцерну, жито, просо, соняшник, арахіс, батат (солодка картопля), кассава (маніок), каву, кокос, ананас, цитрусові дерева, какао, чай, банани, авокадо, інжир, гуайяву, манго, оливи, папайю, кешью, макадамію, мигдаль, овес, овочі, декоративні рослини та шпилькові.

Овочеві культури включають, але не обмежені ними, помідори, салат, зелені боби, лімську квасолю, горох та представників роду Cuscutis, такі як огірок, мускусна диня (диня-канталупка). Декоративні рослини включають, але не обмежені ними, азалію, гортензію, гібіскус, троянди, тюльпани, гладіолуси, петунію, гвоздику, пуансетію і хризантему. Сільськогосподарські рослини також становлять інтерес, включаючи, наприклад, кукурудзу, сорго, пшеницю, соняшник, томати, хрестоцвіті, перець, картоплю, бавовник, рис, сою, цукровий буряк, цукрову тростину, тютюн, ячмінь, озимий ріпак тощо.

Винахід прийнятний для будь-якого представника класу однодольних, включаючи, але не обмежуючись ними, кукурудзу, рис, ячмінь, овес, пшеницю, сорго, жито, цукрову тростину, ананас, ямс, цибулю, банан, кокос та фініки.

J. Способи для підвищення врожайності рослин

Забезпечуються способи для підвищення врожайності. Методи включають забезпечення рослини, що полягає у введенні в рослину або рослинну клітину, полінуклеотиду, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує HPPD винаходу, вирощування рослини або її насіння у польових умовах, та отримання врожаю із вказаної рослини та насіння. Як тут визначається, термін "урожай" рослини стосується кількості та/або якості біомаси, утвореної рослиною. Під "біомасою" розуміють будь-який вимірюваний рослинний продукт. Підвищення біомаси являє собою будь-яке покращення виходу вимірюваного рослинного продукту. Підвищення врожайності рослин має декілька аспектів комерційного застосування. Наприклад, підвищення біомаси листків рослин може підвищити врожайність листових овочів для споживання людиною чи твариною. Крім того, підвищення біомаси листків може бути використане для підвищення виробництва рослинних фармацевтичних і промислових продуктів. Підвищення врожайності може включати будь-яке статистично достовірне підвищення, включаючи, але не обмежуючись

ними, щонайменше 1 % підвищення, щонайменше 3 % підвищення, щонайменше 5 % підвищення, щонайменше 10 % підвищення, щонайменше 20 % підвищення, щонайменше 30 %, щонайменше 50 %, щонайменше 70 %, щонайменше 100 % або більше підвищення.

У специфічних способах, рослина, яка включає HPPD послідовність винаходу, обробляється ефективною концентрацією HPPD гербіциду, такого як один або більше гербіцидів – інгібіторів HPPD, обраних з групи, яка складається з гербіцидів - HPPD інгібіторів класу N-(1,2,5-оксадіазол-3-їл)бензамідів, N-(тетразол-4-їл)- або N-(тріазол-3-їл)арилкарбоксамідів, таких як 2-хлоро-3-етокси-4-(метилсульфоніл)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-їл)бензамід і 2-Хлоро-3-(метоксиметил)-4-(метилсульфоніл)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-їл)бензамід, трикетонів, таких як темботріон, сулькотріон та мезотріон, класу ізоксазолів, таких як ізоксафлутол, або класу піразолінатів, таких як пірасульфотол і топрамезон, зокрема, обраних із темботріону, сулькотріону, топрамезону, біциклопірону, тефурилтріону, ізоксафлутолу та мезотріону, де застосування приводить до підвищеної врожайності рослин.

Забезпечуються способи для надання стійкості до гербіцидів рослинам або частинам рослин. У таких способах, нуклеотидна послідовність, що кодує HPPD винаходу, вводиться в рослину, де експресія полінуклеотиду призводить до стійкості до гербіцида - HPPD інгібітора. Рослини, отримані з використанням цього методу, можуть бути оброблені ефективною концентрацією гербіциду (такого як один або більше гербіцидів - HPPD інгібіторів, обраних серед групи, яка складається з гербіцидів - HPPD інгібіторів класу N-(1,2,5-оксадіазол-3-їл)бензамідів, N-(тетразол-4-їл)- або N-(тріазол-3-їл)арилкарбоксамідів, таких як 2-хлоро-3-етокси-4-(метилсульфоніл)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-їл)бензамід і 2-Хлоро-3-(метоксиметил)-4-(метилсульфоніл)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-їл)бензамід, трикетонів, таких як темботріон, сулькотріон і мезотріон, класу ізоксазолів, таких як ізоксафлутол або класу піразолінатів, таких як пірасульфотол і топрамезон, зокрема, обраних серед темботріону, сулькотріону, топрамезону, біциклопірону, тефурилтріону, ізоксафлутолу і мезотріону) і виявляють підвищену толерантність до гербіциду. "Ефективна концентрація" гербіциду в цій заявці являє собою кількість, достатню для того, щоб уповільнити або зупинити ріст рослин або частин рослин, які не мають природної стійкості чи вважаються толерантними до гербіциду.

К. Способи контролю бур'янів у польових умовах

Цей винахід відповідно стосується способу контролю небажаних рослин або регулювання росту рослин у сільськогосподарських культурах рослин, які включають нуклеотидну послідовність, що кодує HPPD згідно з винаходом, де один або більше гербіцидів - HPPD інгібіторів, наприклад, один або більше гербіцидів - HPPD інгібіторів, обраних з класу N-(1,2,5-оксадіазол-3-їл)бензамідів, N-(тетразол-4-їл)- або N-(тріазол-3-їл)арилкарбоксамідів, таких як 2-хлоро-3-етокси-4-(метилсульфоніл)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-їл)бензамід і 2-хлоро-3-(метоксиметил)-4-(метилсульфоніл)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-їл)бензамід, трикетонів, таких як темботріон, сулькотріон і мезотріон, класу ізоксазолів, таких як ізоксафлутол, або класу піразолінатів, таких як пірасульфотол і топрамезон, зокрема, обраних з темботріону, сулькотріону, топрамезону, біциклопірону, тефурилтріону, ізоксафлутолу або мезотріону, застосовуються щодо рослин (наприклад, шкідливих рослин, таких як однодольні або дводольні бур'яни або небажані сільськогосподарські культури), щодо насіння (наприклад зерна, насіння або вегетативних пропагул, таких як бульби або пагони рослин з бруньками) або щодо площі, на якій рослини ростуть (наприклад, площі під культивуванням). У цьому контексті, ефективна концентрація одного або більше гербіцидів – інгібіторів HPPD, наприклад, одного або більше гербіцидів – інгібіторів HPPD, обраних з групи, що включає гербіциди - HPPD інгібітори класу N-(1,2,5-оксадіазол-3-їл)бензамідів, N-(тетразол-4-їл)- або N-(тріазол-3-їл)арилкарбоксамідів, таких як 2-хлоро-3-етокси-4-(метилсульфоніл)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-їл)бензамід і 2-хлоро-3-(метоксиметил)-4-(метилсульфоніл)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-їл)бензамід, трикетонів, таких як темботріон, сулькотріон і мезотріон, класу ізоксазолів, таких як ізоксафлутол, або класу піразолінатів, таких як пірасульфотол і топрамезон, зокрема, обраних серед темботріону, сулькотріону, топрамезону, біциклопірону, тефурилтріону, ізоксафлутолу і мезотріону, можуть бути застосовані, наприклад, перед посадкою (якщо прийнятно, також шляхом внесення в ґрунт), перед появою сходів або після їхньої появи, та можуть бути комбіновані із застосуванням інших гербіцидів, до яких сільськогосподарська культура має природну стійкість, або до яких вона резистентна завдяки експресії одного або більше інших трансгенів резистентності до гербіцидів. Див., напр., Заявку на Патент США № 2004/0058427 і РСТ App. Pub. № WO 98/20144. Під "ефективна концентрація" розуміють концентрацію, яка контролює ріст або розповсюдження бур'янів чи інших трансформованих рослин без істотного впливу на рослини або насіння рослин, які є толерантними до HPPD інгібіторів. Особи з досвідом роботи в галузі мають зрозуміти, що застосування гербіцидів може мати багато різних

форм та мати місце в різний час до та/або протягом висаджування насіння та упродовж процесу росту. "Передсходова" обробка стосується гербіциду, який застосовується щодо площі, яка становить інтерес (напр., поля або площі під культивуванням) перед появою рослин, які видно з ґрунту. "Післясходове" застосування стосується гербіциду, який застосовується щодо площі після появи рослин, які видно з ґрунту. У деяких випадках, терміни "передсходова" та "післясходова" використовуються з посиланням на бур'яни на площі, яка становить інтерес, і у деяких випадках ці терміни використовуються з посиланням на сільськогосподарську рослину на площі, яка становить інтерес. При використанні з посиланням на бур'яни, ці терміни можуть застосовуватись до конкретного типу бур'янів чи видів бур'янів, які присутні, або очікується, що вони будуть присутні на площі, яка становить інтерес. "Передпосівне включення" гербіциду включає введення сполук в ґрунт перед посадкою.

Таким чином, цей винахід включає спосіб контролю бур'янів у польових умовах, який полягає у висадженні в полі рослини або її насіння, що включають HPPD винаходу, та застосування до вказаної рослини або площі, яка оточує вказану рослину, ефективної концентрації одного або більше гербіцидів - HPPD інгібіторів.

В одному втіленні цього винаходу, поле, на якому мають бути висаджені рослини (такі як рослини сої, бавовника, кукурудзи або пшениці, тощо), що містять нуклеотидну послідовність HPPD винаходу, може бути оброблене гербіцидом - інгібітором HPPD, таким як ізоксафлутол (IFT), перед тим, як рослини висаджуються, або насіння висівається, який очищує поле від бур'янів, що знищуються HPPD інгібітором, що дозволяє нульовий обробіток, з подальшим висадженням чи висівом рослин на цьому ж попередньо обробленому полі (суцільна обробка із застосування з використанням гербіциду – інгібітора HPPD). Залишкова активність IFT також захищатиме рослини, що з'являються та ростуть, від конкуренції з бур'янами на ранніх стадіях росту. Коли рослини сягають певного розміру, бур'яни з'являються знову, глюфосинат або гліфосат або HPPD інгібітор чи суміш HPPD інгібітора з іншим гербіцидом, таким як гліфосат, можуть бути застосовані як післясходовий гербіцид по поверхні рослин, якщо такі рослини є толерантними до вказаних гербіцидів.

В іншому втіленні цього винаходу, поле, на якому насіння, що містить HPPD нуклеотидну послідовність винаходу, було висіяне, може бути оброблене гербіцидом - інгібітором HPPD, таким як IFT, перед появою рослин, але після висіву насіння (поле може бути очищене від бур'янів перед посівом насіння за допомогою інших засобів, як правило, традиційних способів обробки ґрунту, таких як оранка, з використанням чизельного плуга, або передсходова обробка насіння), де залишкова активність буде утримувати поле вільним від бур'янів, знищених гербіцидом, в результаті чого рослини, які будуть з'являтися та рости, не будуть конкурувати з бур'янами (передпосівне застосування гербіциду - HPPD інгібітора). Коли рослини досягнуть певного розміру, бур'яни з'являтимуться знову, глюфосинат або гліфосат чи HPPD інгібітор або суміш HPPD інгібітора з іншим гербіцидом, таким як гліфосат, може бути застосований як післясходовий гербіцид по поверхні рослин, якщо такі рослини є толерантними до вказаних гербіцидів.

В іншому втіленні цього винаходу, рослини, що містять HPPD нуклеотидну послідовність винаходу, можуть бути оброблені гербіцидом - інгібітором HPPD, поверх рослин, які з'явилися з насіння, що було висіяно, який очистить поле від бур'янів, убитих HPPD інгібітором, який може бути застосований разом з (напр., у баці робочого розчину), до обробки або після обробки гліфосатом або глюфосинатом як післясходовий гербіцид поверх рослин (післясходове застосування гербіциду - HPPD інгібітора (з гліфосатом або без гліфосату)), якщо такі рослини є толерантними до таких гербіцидів.

Приклади окремих представників однодольних та дводольних бур'янів, які можна контролювати за допомогою гербіциду – інгібітора HPPD, включають:

Однодольні шкідливі рослини родів: *Aegilops*, *Agropyron*, *Agrostis*, *Alopecurus*, *Apera*, *Avena*, *Brachiararia*, *Bromus*, *Cenchrus*, *Commelina*, *Cynodon*, *Cyperus*, *Dactyloctenium*, *Digitaria*, *Echinochloa*, *Eleocharis*, *Eleusine*, *Eragrostis*, *Eriochloa*, *Festuca*, *Fimbristylis*, *Heteranthera*, *Imperata*, *Ischaemum*, *Leptochloa*, *Lolium*, *Monochoria*, *Panicum*, *Paspalum*, *Phalaris*, *Phleum*, *Poa*, *Rottboellia*, *Sagittaria*, *Scirpus*, *Setaria*, *Sorghum*.

Дводольні бур'яни родів: *Abutilon*, *Amarant* таким чином, *Ambrosia*, *Anoda*, *Anthemis*, *Aphanes*, *Artemisia*, *Atriplex*, *Bellis*, *Bidens*, *Capsella*, *Carduus*, *Cassia*, *Centaurea*, *Chenopodium*, *Cirsium*, *Convolvulus*, *Datura*, *Desmodium*, *Emex*, *Erysimum*, *Euphorbia*, *Galeopsis*, *Galinsoga*, *Galium*, *Hibiscus*, *Ipomoea*, *Kochia*, *Lamium*, *Lepidium*, *Lindernia*, *Matricaria*, *Mentha*, *Mercurialis*, *Mullugo*, *Myosotis*, *Papaver*, *Pharbitis*, *Plantago*, *Polygonum*, *Portulaca*, *Ranunculus*, *Raphanus*, *Rorippa*, *Rotala*, *Rumex*, *Salsola*, *Senecio*, *Sesbania*, *Sida*, *Sinapis*, *Solanum*, *Sonchus*, *Sphenoclea*, *Stellaria*, *Taraxacum*, *Thlaspi*, *Trifolium*, *Urtica*, *Veronica*, *Viola*, *Xanthium*.

Гербіциди - HPPD інгібітори, які використовуються у цьому винаході, включають, але не обмежуючись, гербіциди - інгібітори HPPD класу N-(1,2,5-оксадіазол-3-іл)бензамідів, N-(тетразол-4-іл)- або N-(тріазол-3-іл)арилкарбоксамідів, таких як 2-хлоро-3-етокси-4-(метилсульфоніл)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-іл)бензамід та 2-хлоро-3-(метоксиметил)-4-(метилсульфоніл)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-іл)бензамід, трикетонів, таких як темботріон, сулькотріон і мезотріон, класу ізоксазолів, таких як ізоксафлутол або класу піразолінатів, таких як пірасульфотол і топрамезон, зокрема, обраних серед темботріону, сулькотріону, топрамезону, біциклопірону, тефурилтріону, ізоксафлутолу та мезотріону, можуть бути розроблені різними способами, залежно від превалюючих біологічних та/або фізико-хімічних параметрів. Прикладами можливих препаратів є порошки, що змочуються (WP), водорозчинні порошки (SP), водорозчинні концентрати (BPK), концентрати, що емульгуються (EC), емульсії (EW), такі як емульсії олія-у-воді та вода-в-олії, аерозольні розчини, концентрат суспензії (SC), водні або масляні дисперсії, жиророзчинні розчини, капсульні суспензії (CS), дисти (порошки тонкого помелу) (DP), продукти для передпосівної обробки насіння (інкрустація насіння), гранули для застосування шляхом розкидання та на ґрунті, гранули (GR) у вигляді мікрогранул, аерозольні гранули, вкриті гранули та адсорбційні гранули, вододисперсійні гранули (WG), водорозчинні гранули (SG), ULV препаративні форми, мікрокапсули та воски.

Ці індивідуальні типи препаративних форм відомі в принципі та описуються, наприклад, у: Winnacker-Küchler, "Chemische Technologie" [Chemical technology], volume 7, C. Hanser Verlag Munich, 4th Ed. 1986; Wade van Valkenburg, "Pesticide Formulations", Marcel Dekker, N.Y., 1973; K. Martens, "Spray Drying" Handbook, 3rd Ed. 1979, G. Goodwin Ltd. London.

Препаративні форми потребують допоміжних речовин, таких як інертні матеріали, сурфактанти, розчинники або додаткові аддитивні речовини, також відомі та описані, наприклад, у: Watkins, "Handbook of Insecticide Dust Diluents and Carriers", 2nd Ed., Darland Books, Caldwell N.J., H.v. Olphen, "Introduction to Clay Colloid Chemistry", 2nd Ed., J. Wiley & Sons, N.Y.; C. Marsden, "Розчинники Guide", 2nd Ed., Interscience, N.Y. 1963; McCutcheon's "Detergents and Emulsifiers Annual", MC Publ. Corp., Ridgewood N.J.; Sisley and Wood, "Encyclopedia of Surface Active Agents", Chem. Publ. Co. Inc., N.Y. 1964; Schönfeldt, "Grenzflächenaktive Äthylenoxidaddukte" [Interface-active ethylene oxide adducts], Wiss. Verlagsgesell., Stuttgart 1976; Winnacker-Küchler, "Chemische Technologie" [Chemical technology], volume 7, C. Hanser Verlag Munich, 4th Ed. 1986.

Основою на цих препаративних формах, можна також приготувати комбінацію з іншими пестицидно активними речовинами, такими як, наприклад, інсектициди, акарициди, гербіциди, фунгіциди, сафенери, з добривами та/або регуляторами росту, наприклад у вигляді готової суміші або у баці з робочим розчином.

L. Способи введення гена винаходу в іншу рослину

Тут також пропонуються способи введення HPPD нуклеотидної послідовності винаходу в іншу рослину. HPPD нуклеотидна послідовність винаходу, або її фрагмент, може бути введена в іншу рослину за допомогою рекурентної селекції, зворотного схрещування, селекційного розведення (покращення сорту), лінійного розведення, масової селекції, мутаційної селекції та/або селекції з використанням генетичного маркера.

Таким чином, в одному втіленні, способи винаходу включають схрещування першої рослини, яка включає HPPD нуклеотидну послідовність винаходу, з другою рослиною для отримання рослин потомства F1 та відбору рослин потомства F1, які є толерантними до гербіцидів - інгібіторів HPPD, або які включають HPPD нуклеотидну послідовність винаходу. Методи можуть також включати схрещування відібраних рослин-нащадків з першою рослиною, що включає HPPD нуклеотидну послідовність винаходу для отримання рослин, нащадків від зворотного схрещування та відбору рослин, нащадків від зворотного схрещування, які є толерантними до гербіцидів - інгібіторів HPPD, або які включають HPPD нуклеотидну послідовність винаходу. Способи для оцінки стійкості до гербіцида - HPPD інгібітора забезпечуються тут в іншому місці. Методи можуть також включати повтори цих етапів один або більше разів у послідовності, для того щоб отримати друге або вище потомство рослин від зворотного схрещування, які є толерантними до гербіцидів - інгібіторів HPPD або які включають HPPD нуклеотидну послідовність винаходу.

Будь-який метод схрещування, який включає селекцію рослин на бажаний фенотип, може бути використаний у способах цього винаходу. В деяких втіленнях, рослини F1 можуть бути самозапилені для отримання покоління F2, яке розщеплюється (segregue). Окремі рослини, які представляють бажаний фенотип (напр., стійкість до гербіцида - HPPD інгібітора), можуть бути відібрані у кожному поколінні (F3, F4, F5 тощо) до того часу, поки ознаки не стануть гомозиготними або не будуть закріплені у селекційній популяції.

Друга рослина може бути рослиною, яка має бажану властивість, таку як толерантність до гербіцидів, стійкість до комах, стійкість до посухи, стійкість до нематоди, ефективність використання води, ефективність використання азоту, покращене поживне значення, резистентність до захворювань, підвищений фотосинтез, покращена якість волокон, стрестолерантність, покращена репродукція тощо. Друга рослина може бути елітною подією, як описано тут в іншому місці.

У різних втіленнях, частини рослин, цілі рослини, органи рослин (напр., листки, стебла, корені тощо), насіння, рослинні клітини, пропагули, зародки, і т.п.) можуть бути зібрані з отриманих гібридів і або розмножені чи зібрані для подальшого використання (такого як продовольчі продукти, корми для тварин, біопаливо, олія, борошно, борошно крупного помелу, тощо).

М. Способи отримання рослинного продукту

Цей винахід також стосується процесу отримання товарного продукту, який включає збір та/або перемелювання зерна сільськогосподарських культур, які включають HPPD послідовність винаходу, для отримання товарного продукту. Агрономічно або комерційно важливі продукти та/або їх композиції включають, але не обмежуються ними, корми для тварин, предмети споживання і рослинні продукти, побічні продукти, які призначені для використання у вигляді харчових продуктів для споживання людиною, або для використання у композиції, і предметів споживання, які призначені для споживання людиною, насамперед, девіталізоване насіння/зернові продукти, включаючи (напів)оброблені продукти, виготовлені з таких зернових продуктів /насіння, де вказаний продукт являє собою або містить ціле чи перероблене насіння або зерно, корми для тварин, кукурудзяне чи соєве борошно крупного помелу, кукурудзяне або соєве борошно, кукурудзу, кукурудзяний крохмаль, соєве борошно, пластівці, соєвий білковий концентрат, соєвий білковий ізолят, текстуризований соєвий білковий концентрат, косметичку, продукти для догляду за волоссям, олію із соєвого насіння, натто, темпех, гідролізований соєвий білок, збиті вершки, шортенінг, лецитин, їстівну цільну сою (сиру, смажену або зелені соєві боби), соєвий йогурт, соєвий сир, тофу, юба, а також варену, шліфовану, приготовлену на пару, печене або оброблене паром зерно, тощо, знаходять в межах цього винаходу, якщо ці продукти або їх композиції містять кількості нуклеотидних та/або амінокислотних послідовностей, які можна виявити, представлених тут як діагностичних для будь-якої рослини, що містить такі нуклеотидні послідовності.

Наступні приклади представлені у вигляді ілюстрацій, а не для обмеження.

Експериментальна частина

Приклад 1. Приготування HPPD мутантного G336W (PfG336W) *Pseudomonas fluorescens* та кінетична характеристика HPPD ферментів.

Нуклеотидна послідовність нативного HPPD *Pseudomonas fluorescens* (PfHPPD, 1077 bp, описаного в WO2009144079), що кодує амінокислотну послідовність, наведену тут як SEQ ID №:1, і описану в WO2009144079, WO 96/38567, і у Rüetschi et al. (Eur. J. Biochem., 205, 459-466, 1992), була спочатку клонована в унікальному NcoI сайті експресуючого вектора pKK233-2 (Pharmacia), який забезпечує старт-кодон.

На 5'-кінці, безпосередньо "даунстрім" ATG, була вставлена послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує амінокислоту аланін та послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує N-термінальний HIS6-Tag (6x HIS, закодований: cat cac cat cac cat cac (SEQ ID №:77). "Апстрім" ATG додали дві додаткові пари цистеїнових основ, для того щоб отримати послідовність, яка відповідає сайту розпізнавання ферментів рестрикції NcoI, а "даунстрім" від стоп-кодону додали послідовності, які відповідають сайтам розпізнавання рестриктази XbaI. Послідовність ДНК, що відповідає гену, включаючи послідовність, яка кодує HIS-TAG, була відрізана рестрикційними ферментами NcoI та XbaI, і після цього клонована в модифікований експресуючий вектор pSE420(RI)NX (5261 bp).

Клонуючий та експресуючий вектор pSE420(RI)NX (5261 bp) базується на плазміді pSE420 від фірми Invitrogen (Карлсруе, Німеччина). Модифікації цього вектора включають додавання nptII гена (неоміцин фосфотрансфераза; Sambrook and Russell, 2001, Molecular Cloning: a laboratory manual (Third edition)), що надає стійкості до антибіотика канаміцину і який відсутній у більшості суперлінкерних ділянок (множинних сайтів клонування).

Плазміда несе trp-lac (trc) промотор і lacI^q ген, який забезпечує lac репресор у кожному штамі клітини-господаря *E. coli*. Lac репресор зв'язується з lac оператором (lacO) і обмежує експресію цільового гена; це інгібування може бути послаблене індукцією за допомогою ізопропіл β-D-1-тіогалактопіранозиду (IPTG).

Отриманий вектор був названий pSE420(RI)NX-PfHPPD і використаний для трансформування клітин BL21 *Escherichia coli* (Merck, Дармштадт, Німеччина).

До плазміди pSE420(RI)NX-PfHPPD застосували ПЛР-опосередкований мутагенез, для того щоб змінити визначений кодон у відповідних сайтах PfHPPD гена. Кодон, який кодує гліцин (G) у положенні 336, був заміщений кодоном, що кодує триптофан (W). Отриманий мутант був названий PfG336W, а отриманий вектор - pSE420(RI)NX-PfG336W.

Експресію HPPD проводили в клітинах BL21 E. coli K-12, які містять pSE420(RI)NX-PfHPPD або pSE420(RI)NX-PfG336W. Клітини вирощували до досягнення значення оптичної щільності, яке становило 0,5; після чого була ініційована експресія з *trp-lac* (*trc*) промотора шляхом індукції з використанням 1 mM IPTG, який зв'язується з *lac* репресором і викликає його дисоціацію з *lac* оперону. Експресію проводили протягом понад 15 год. при 28 °C.

Для того щоб приготувати престартерну культуру, 2 мл ТВ середовища (100 мкг*мл⁻¹ карбеніциліну) інокулювали 50 мкл вихідного розчину E. coli K-12 BL21 у гліцерині. Престартерну культуру інкубували при 37 °C на шейкері при 140 об/хв протягом 15 год. 200мкл престартерної культури було використано для ініціації стартерної культури (5мл ТВ, з додаванням 100 мкг*л⁻¹), яку інкубували протягом 3 год. при 37 °C.

Для того щоб приготувати основну культуру, 400 мл ТВ середовища (100 мкг*мл⁻¹ карбеніциліну) інокулювали 4 мл стартерної культури. Стартерну культуру інкубували при 37 °C при струшуванні 140 об/хв до досягнення OD₆₀₀, що становило 0,5. Після цього експресію рекомбінантного білка індукували за допомогою 400 мкл 1M розчину IPTG. Клітини вирощували протягом додаткової години за цих же умов, після чого температуру знижували до 28 °C, а культуру струшували при 140 об/хв протягом 15 год. Клітини збирали центрифугуванням при 6000 x g протягом 15 хв при 4 °C. Після цього клітинні пелети зберігали при -80 °C.

Виділення та очищення His₆-PfHPPD та His₆-PfG336W у нативному вигляді

Лізис клітин

Лізис клітин проводили за допомогою лізоциму, ферменту, який викликає розщеплення 1,4-β-зв'язків між залишками N-ацетилмурамової кислоти та N-ацетил-D-глюкозаміну в пептидоглікані, який утворює клітинні стінки у бактерій. Клітинні мембрани після цього руйнувались під внутрішнім тиском бактеріальних клітин. Крім того, буфер для лізису містив Benzonase[®] нуклеазу, ендонуклеазу, яка гідролізує всі форми ДНК та РНК без ушкодження білків і, таким чином, значно зменшує в'язкість клітинного лізату. Лізис за природніх умов виконували на кризі. Для очищення His₆-мічених білків був використаний набір QIAexpress[®] Ni-NTA Fast Start Kit згідно з рекомендаціями виробника.

Очищення His₆-мічених білків за допомогою афінної хроматографії з імобілізованими іонами металу (IMAC)

Очищений клітинний лізат (10 мл), отриманий після центрифугування реакційної лізисної суміші, завантажували в колонку Ni-NTA Fast Start Column з QIAexpress[®] Ni-NTA Fast Start Kit (Qiagen, Hilden, Німеччина); очищення проводили згідно з інструкціями виробника. His₆-мічений білок елюювали 2,5 мл елюційного буферу.

Знесолення HPPD розчинів гель-фільтрацією

Розчини HPPD, елюйовані з колонки Ni-NTA Fast Start Column з використанням 2,5 мл елюційного буферу, наносили на Sephadex G-25 PD-10 колонку (GE Healthcare, Фрайбург, Німеччина), згідно з інструкціями виробника. Після того, як весь зразок пройшов гелевий шар, було проведено елюювання за допомогою 3,5 мл накопичувального буферу.

Розчини HPPD, елюйовані із знесолюючої колонки, заморожували при -80 °C в 1 мл аліквотах.

Визначення концентрації HPPD білка за допомогою аналізу білка Бредфорда

Концентрацію білка визначали за допомогою стандартної методики Бредфорда (Bradford, (1976), Anal Biochem 72: 248-254).

Визначення чистоти розчинів HPPD за допомогою SDS-PAGE

Цілісність елюйованого білка перевіряли за допомогою SDS-PAGE гель-електрофорезу з використанням гелю NUPAGE[®] Novex 4-12 % Bis-Tris Gels (Invitrogen, Карлсруе, Німеччина); було завантажено приблизно 10 мкг білка. Десять мкл Laemmli Sample буферу додавали до 1-10 мкл розчину білка, суміш інкубували при 90 °C протягом 10 хв. Після короткого етапу центрифугування всю суміш завантажували в касету в SDS гелі, попередньо зафіксовану в гелевій камері XCell SureLock[™] Novex Mini-Cell, заповнений проточним буфером NuPAGE[®] MOPS SDS (розведеним із 20 x-розчину з використанням води). Після цього до гелевої камери подавалась напруга 150 протягом 1 год. Для забарвлювання білкових смуг гель занурювали в забарвлюючий розчин Кумасі діамантового блакитного R-250. Для знебарвлення поліакриламідного гелю, його занурювали у знебарвлюючий розчин Кумасі діамантового блакитного R-250 доти, поки білкові смуги на ставали блакитними на білому гелі.

Приклад 2. Кінетична характеристика та оцінювання толерантності до HPPD інгібіторів

HPPD ферментів PfHPPD та PfG336W.

HPPD активність було досліджено за допомогою стандартного спектрофотометричного аналізу (який описується в WO 2009/144079, включеному тут у повному обсязі у вигляді посилання).

5 Визначення кінетичних властивостей HPPD in vitro

Значення K_m , V_{max} , та K_{cat} для різних препаратів HPPD ферментів та K_i , $K_1=K_{on}$, та $K_{-1}=K_{off}$ для різних HPPD інгібіторів визначали або вони могли бути визначені за допомогою HPLC аналізу для визначення HPPD активності. Досліджувані суміші містили в об'ємі 1 мл 150 мМ Tris-HCl буферу при pH 7,8, 10 мМ аскорбату натрію, 650 одиниць бичачої каталази (Sigma C30 (Sigma-Aldrich, Мюнхен, Німеччина), 34 мг білка/мл, 23,000 одиниць/мг), та відповідну кількість HPP, очищеного HPPD фермента та HPPD інгібіторів. Для визначення K_m , V_{max} , та K_{cat} значень, концентрація HPP у досліджуваній суміші варіювала від 10 до 400 мкМ. Для визначення K_i , $K_1=K_{on}$, та $K_{-1}=K_{off}$ значень, 2 мМ HPP були використані або можуть бути використані. Всі тести розпочинали додаванням HPPD ферменту до досліджуваної суміші і зупиняли в серіях різних проміжків часу між 0 та 240 сек додаванням 200 мкл реакційної суміші до пробірок із реакційними сумішами, що містять 20 мкл 10 % (пер)хлорної кислоти. Осаджений білок пелетували 5-хвилинним центрифугуванням при 10,000 g. 100 мкл супернатанту завантажували в 250×4мм Knauer (Берлін, Німеччина) Eurospher 100-5 C18-колонку, урівноважену за допомогою 10 % метанолу, 0,1 % трифтороцтової кислоти (буфер А). Колонку елюювали також зі швидкістю 1,5 мл/хв, використовуючи 4-хвилинне промивання буфером А, з подальшим 3-хвилинним промиванням 95 % метанолом, далі – з 2-хвилинним промиванням буфером А. Моніторинг елюювання HGA (гомогентизинової кислоти) та HPP (гідроксифенілпірувату) здійснювали при 292 нм. HGA елюювали протягом приблизно 5 хвилин, а HPP – довше. Був використаний стандартний набір концентрацій HGA для побудови стандартної кривої, для того щоб калібрувати пік поглинання HGA при 292 нм залежно від концентрації HGA.

Для визначення значень K_m та V_{max} , початкові значення швидкості HPPD реакції при різних концентраціях субстрату визначали за графіками залежності HGA від часу та узгоджували з рівнянням Міхаеліса-Ментен для односубстратних ферментативних реакцій за допомогою пакету програмного забезпечення ID Business Solutions Ltd. (www.idbs.com) XLfit. Для визначення значення K_i , $K_1=K_{on}$, та $K_{-1}=K_{off}$, протікання в часі HPPD реакції при різних концентраціях інгібітора узгоджували з рівняннями для механізму А, конкурентного інгібування, для інгібіторів щільного зв'язку (Cha, S. (1975) Tight-binding inhibitors – I. Kinetic behaviour. Biochemical Pharmacology 24, 2177-2185) за допомогою пакету програмного забезпечення ID Business Solutions Ltd. XLfit.

35 Таблиця 1: Кінетична характеристика HPPD ферментів (Pf HPPD та PfG336W).

У наведеній нижче Таблиці 1, "Km" (константа Міхаеліса-Ментен) означає кінетичний параметр, який використовується для характеристики ферментативних реакцій; він визначається як концентрація субстрату, при якій швидкість реакції дорівнює половині максимальної. Km також визначається як концентрація субстрату, при якій швидкість реакції досягає свого максимального значення ($V_{max}/2$), де V_{max} – максимальна швидкість реакції.

$K_{on}=K_1$ дорівнює константі швидкості асоціації зв'язування фермент-субстратного комплексу, а $K_{off}=K_{-1}$ дорівнює швидкості дисоціації фермент-субстратного комплексу. K_i визначає константу інгібування. Для визначення специфічної активності ферментів, зразки інкубували, реакцію зупиняли через 24 хв. Специфічну активність оцінювали за кількістю мкг білка.

Таблиця 1

	HPP	HPP	Специфічна активність
	K_m (мкМ)	K_{cat} (сек ⁻¹)	$\Delta E/24\text{хв}$ мкг білка
PfHPPD	187	4,4	0,76
PfG336W	141	5,4	0,40

Таблиця 1 свідчить, що кінетичні параметри K_m і K_{cat} бактеріального HPPD (PfHPPD) "дикого типу" і мутантного HPPD (PfG336W) не виявляли істотних відмінностей. Однак, специфічна активність була істотно нижчою у мутанта у порівнянні з білком "дикого типу".

50 Визначення HPPD активності у присутності декількох HPPD інгібіторів

У цьому сенсі, pl_{50} -значення означає log значення концентрації інгібітора, необхідної для 50 % інгібування ферментативної активності в молярній концентрації.

pl_{50} -значення для HPPD інгібіторів визначали з графіка залежності доза-реакція HPPD

активності залежно від концентрації інгібітора за допомогою тесту, докладно описаного в WO 2009/144079, при фіксованій - 2 мМ - концентрації HPP і фіксованій тривалості інкубування - 3 хвилини - з використанням пакету програмного забезпечення ID Business Solutions Ltd. XLfit.

Значення pI_{50} PfHPPD та PfG336W ферментів визначали з використанням спектрофотометричного методу. Було визначено стійкість до декількох, перелічених нижче HPPD інгібіторів, - темботріону, дикетонітрилу, мезотріону. Символ ">" означає, що значення були значно вищими, ніж було встановлено будь-яким, однак вони не могли бути точно підраховані в інтервалі протестованих концентрацій інгібітора ($5,0 \times 10^{-6}$, $1,0 \times 10^{-5}$, $2,5 \times 10^{-5}$, $4,0 \times 10^{-5}$, $7,0 \times 10^{-5}$, $1,0 \times 10^{-4}$, $2,0 \times 10^{-4}$ та $5,0 \times 10^{-4}$ М). У цьому експерименті, зняття даних проводили через 24 хв після початку експерименту. Результати представлені в Таблиці 2.

Таблиця 2

	Темботріон	Дикетонітрил	Мезотріон
PfHPPD	>5,6	>5,6	>5,6
PfG336W	>5,6	4,9	5,3

Значення pI_{50} HPPD ферментів також було визначено за допомогою HPLC методу. Була визначена стійкість до HPPD інгібіторів - темботріону, дикетонітрилу та мезотріону. У цьому експерименті, визначення було проведено через 3 хв після початку експерименту. Результати представлені в Таблиці 3.

Таблиця 3

	Темботріон	Дикетонітрил	Мезотріон
PfHPPD	4,9	4,7	4,7
PfG336W	4,6	4,2	4,3

В альтернативному методі вимірювання HPPD активності та HPPD стійкості до HPPD інгібіторів, HPPD активність визначали при кімнатній температурі додаванням відповідних кількостей HPPD до розчину 200 мМ Tris-HCl pH 7,6, 10 мМ аскорбату, 20 мкМ FeSO₄, 650 одиниць каталази, 8 мкг HGA деоксигенази (HGA: гомогентизат) та 10-100 мкМ HPP у загальному об'ємі 1 мкл. Початкову швидкість реакції визначали від підвищення поглинання при 318 нм завдяки утворенню малеїлацетацетату ($\epsilon_{318}=11,900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Значення K_m та V_{max} визначали узгодженням початкової швидкості перетворення HPP, визначеної при різних концентраціях HPP, з рівнянням Міхаеліса-Ментен за допомогою пакету програмного забезпечення Model 350 ID Business Solutions Ltd XLfit, версія 5.1.0.0. Цей метод називається HGD аналізом.

Значення pI_{50} HPPD ферментів визначали за допомогою спряженого аналізу HPPD (HGD; PfHPPD та PfG336W) та їх відповідної стійкості до HPPD інгібіторів темботріону, дикетонітрилу та мезотріону. Результати представлені в Таблиці 4.

Таблиця 4

	Темботріон	Дикетонітрил	Мезотріон
PfHPPD	6,4	5,8	5,8
PfG336W	6,0	5,3	5,3

На Таблицях 2, 3 і 4, чітко видно, що мутація в положенні 336 фермента HPPD від *Pseudomonas fluorescens* істотно підвищила стійкість HPPD до декількох HPPD інгібіторів.

Приклад 3. Бібліотека точкових мутацій першого покоління.

PfG336W мутант був далі мутагенізований у 16 положеннях. Рандомізація цих положень була виконана з використанням набору QUIKCHANGE® lightning kit. Теоретичне різноманіття бібліотеки становило 300. Мутанти були зібрані та трансформовані в клітинах DH5alpha E. coli. Був проведений скринінг 600 окремих клонів на толерантність до темботріону (TBT) – HPPD інгібітора. Клони вирощували на LB середовищах з додаванням канаміцину при 37 °C на шейкері до досягнення оптичної щільності OD₆₀₀ нм, яке становило 0,3. Після цього культури переводили на 30 °C та інкубували протягом додаткових 17 годин. Культури центрифугували, клітинний конгломерат ресуспендували в 10 мМ Hepes/KOH pH 7,6, 4 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT. Лізис клітин проводили за допомогою "бісерного млинка" (Bead-Beater), а розчинні клітинні

екстракти були отримані після центрифугування.

Мутанти були проаналізовані з використанням "тестування на коричневий колір". Конкретно, екстракти HPPD аналізували у 96-коміркових планшетах на стійкість HPPD інгібітора нанесенням на тверді середовища, які містять LB-агар, канаміцин, 5 мМ тирозин, 42 мМ сукцинат та HPPD інгібітор. При первинному скринінгу, 20 мкл екстракту наносили у трикратній повторності на планшети, що містять 250 мкМ темботріону. Планшети накривали повітропроникною плівкою та інкубували при 37 °C. Через 24 годин було здійснено візуальне порівняння утворення коричневого пігменту у порівнянні зі зразком, що містить PfG336W. Варіанти, які виявляли підвищене утворення пігменту у присутності TBT, були повторно досліджені на 250 мкМ TBT та 250 мкМ дикетонітрилу (DKN) активної сполуки ізоксафлутолу (IFT). Ті варіанти, які знову виявили покращену толерантність до інгібітора, знову експресували, а екстракт титрували на 250 мкМ TBT та 250 мкМ DKN, для того щоб визначити ступінь покращення. Зразки екстрактів аналізували за допомогою SDS-PAGE; в результаті чого було встановлено, що екстракти містять однакові кількості HPPD білка.

Титрування показало, що варіант PfHPPDEvo33 (SEQ ID №:6) має 4x покращену стійкість до TBT та DKN у порівнянні з PfG336W. Цей варіант мав заміщення проліну на глутамінову кислоту в положенні 335 відносно PfG336W. Ця мутація локалізується на с-термінальній альфа-спіралі, що діє як вхідні ворота до активного сайту.

Приклад 4. Скринінг бібліотеки пермутацій у другому поколінні.

Послідовності варіантів першого покоління, які показали найкращі результати, були проаналізовані; була генерована бібліотека пермутацій другого покоління в ділянці, яка об'єднує положення 335, 336, 339, 340. Теоретична різноманітність бібліотеки становила 640. Скринінг було проведено, як описано в Прикладі 3. Була генерована інша бібліотека пермутацій другого покоління, націлена на положення 188, 189 та 190; кількісне визначення було проведено за допомогою тестування коричневого кольору.

Дані титрування показали, що варіант PfHPPDEvo36 (SEQ ID №:7) мав 16x покращену стійкість до TBT та DKN у порівнянні з PfG336W. Він має 4x покращену стійкість у порівнянні з PfHPPDEvo33. Експресію білка аналізували з використанням SDS-PAGE; було виявлено, що варіанти експресують однакові кількості HPPD білка. PfHPPDEvo36 має заміщення серину на глутамінову кислоту в положенні 335, серину на триптофан у положенні 336, треоніну на лізин у положенні 339, глутаміну на аланін у положенні 340 по відношенню до PfG336W.

Дані титрування показали, що варіант PfHPPDEvo37 (SEQ ID №:3) мав покращену стійкість до TBT та DKN у порівнянні з PfG336W. PfHPPDEvo37 має заміщення триптофану на аланін у положенні 188 порівняно з PfG336W. Був проведений SDS-PAGE аналіз, який не виявив відмінностей в рівнях HPPD експресії між варіантами.

Наведені нижче дані титрування свідчать, що варіант PfHPPDEvo40 (SEQ ID №:8) мав покращену стійкість до TBT і DKN у порівнянні з PfG336W. Був проведений SDS-PAGE аналіз, який не виявив відмінностей в рівні HPPD експресії між варіантами.

Варіанти бли протестовані, шляхом нанесення цілих клітин *E. coli*, які експресують HPPD, на середовища, які містять різні HPPD інгібітори. Для цих експериментів, DH5alpha клітини, які містять плазміди, що експресують HPPD, вирощували на середовищі + канаміцин до досягнення $OD_{600nm} = 0.5$. Серійні розведення клітин були отримані в LB середовищі + канаміцин, що відповідає OD_{600} значенню, що становить 0,016, 0,008, 0,004 та 0,002. Десять мікролітрів кожного розведення наносили у трикратній повторності на планшети, які не містять HPPD інгібітора, містять 250 мкМ TBT, 250 мкМ DKN та 250 мкМ мезотріону (MST). Планшети інкубували протягом 18 годин при 37 градусах C. Був проведений SDS-PAGE аналіз; жодних відмінностей в рівнях експресії HPPD між варіантами виявлено не було.

PfHPPDEvo40 та PfHPPDEvo41 (SEQ ID №:16) виявили підвищену толерантність до TBT і MST у цьому дослідженні у порівнянні з PfG336W.

Приклад 5. Ферментативний аналіз пермутаційних мутантів.

Кінетичну активність (PfHPPD фермента порівняли з декількома пермутаційними мутантами, результати представлені в Таблиці 5 нижче. "Km" (константа Міхаеліса-Ментен) означає кінетичний параметр, який використовується для характеристики ферментативних реакцій; він визначається як концентрація субстрату, при якій швидкість реакції дорівнює половині максимальної. Km також визначається як концентрація субстрату, при якій швидкість реакції досягає свого максимального значення ($V_{max}/2$), де V_{max} має значення максимальної швидкості реакції.

Для визначення специфічної активності ферментів, зразки інкубували, а реакцію зупинили через 24 хв. Специфічну активність оцінювали за мкг білка.

Таблиця 5

	HPP	HPP	SEQ ID №:
	K_m (мкМ)	Kcat (сек ⁻¹)	
PfHPPD	187	4,4	1
PfG336W	141	5,4	2
PfHPPDEvo37	220	3,0	3
C023E6	424	6,9	4
C024H11	188	0,8	5
PfHPPDEvo33	581	2,3	6
PfHPPDEvo36	602	3,3	7
PfHPPDEvo40	509	3,2	8
CO210d10	1181	1,4	9
CO212f3	297	0,9	10
C644	232	0,5	11
C645	156	0,8	12
c0216C6	1541	1,2	14
c0213H10	489	2,6	15
PfHPPDEvo41	336	1,1	16

Специфічну активність HPPD з *Pseudomonas fluorescens* HPPD (PfHPPD) та його мутантів отримували за допомогою спектрофотометричного методу. Зразки інкубували, реакцію зупиняли через 24 хв. Специфічну активність оцінювали за мкг білка.

5

Таблиця 6

HPPD	Специфічна активність (Дельта-абсорбція / 24хв / мкг білка)	SEQ ID №:
PfHPPD	0,76	1
PfG336W	0,4	2
PfHPPDEvo37	0,36	3
C023E6	0,38	4
C024H11	0,07	5
PfHPPDEvo33	0,25	6
PfHPPDEvo36	0,82	7
PfHPPDEvo40	0,42	8
CO210d10	0,43	9
CO212f3	0,42	10
C644	0,38	11
C645	0,36	12
c0218A5	0,13	13
c0216C6	0,50	14
c0213H10	0,51	15
PfHPPDEvo41	0,44	16
C0228G9	0,17	17
C0232D2	0,06	18
C0234A4	0,33	19
C0235F6	0,53	20
C0235E2	0,34	21
C0236H7	0,36	22
C0236F8	0,47	23
C0240D2	0,32	24
C0240D12	0,29	25
C0242D4	0,21	26
C0244A2	0,25	27
C0244F5	0,22	28
C0247B6	0,37	29
C0247H7	0,28	30
C0252F11	0,26	31

Таблиця 6

HPPD	Специфічна активність (Дельта-абсорбція / 24хв / мкг білка)	SEQ ID №:
C0255B12	0,21	32
C0255C1	0,17	33
C0255C3	0,19	34
C0255E6	0,15	35
C0255E10	0,24	36
C0256B1	0,31	37
C0256G11	0,33	38
C0256H4	0,19	39
C0257C5	0,3	40
C0260E11	0,79	41
C0260C6	0,51	42
C0262C4	0,81	43
C0262F11	0,76	44
C0263B7	0,43	45
C0263G12	0,77	46
C0261H2	0,42	47
C0264G5	0,71	48
C0264G7	0,35	49
C0266A11	0,33	50

Як показано в Таблиці 6, не було відмічено істотної відмінності в активності між білком "дикого типу" та більшістю мутантів фермента. Відповідно, очевидно, виявлену толерантність можна пояснити внутрішніми властивостями ферменту, а не дисфункцією або уповільненням активності при конвертації 4-гідроксифенілпірувату в гомогентизат.

Стійкість до дикетонітрилу (активна форма ізоксафлутолу) та мезотріону також визначали спектрофотометрично. Значення, представлені як pI₅₀. ">", означають, що це значення знаходиться поза інтервалом вимірів цього тесту (напр., фермент є більш чутливим, ніж значення, наведені після цього).

Таблиця 7

HPPD	pI ₅₀ Дикетонітрил	pI ₅₀ Мезотріон
	OD	OD
PfHPPD	>5,6	>5,6
PfG336W	4,9	5,3
PfHPPDEvo37	4,7	5,3
C023E6	4,4	5,5
C024H11	4,1	4,6
PfHPPDEvo33	4,3	5,1
PfHPPDEvo36	4,5	н.в.
PfHPPDEvo40	3,5	4,9
CO210d10	4,3	5,7
CO212f3	4,7	5,4
C644	5,3	>5,6
C645	>5,6	>5,6
c0218A5	4,4	5,1
c0216C6	4,0	4,9
c0213H10	4,9	5,2
PfHPPDEvo41	3,4	4,7
C0228G9	5,4	5,7
C0232D2	5,1	5,5
C0234A4	4,9	>5,6
C0235F6	4,7	5,5
C0235E2	4,7	5,4
C0236H7	4,7	5,3

Таблиця 7

HPPD	pl ₅₀ Дикетонітрил	pl ₅₀ Мезотріон
C0236F8	4,9	>5,6
C0240D2	4,9	5,4
C0240D12	4,5	5,0
C0242D4	3,6	4,5
C0244A2	4,7	5,6
C0244F5	4,3	5,3
C0247B6	5,1	>5,6
C0247H7	4,4	5,2
C0252F11	3,7	4,6
C0255B12	4,0	5,0
C0255C1	3,6	4,7
C0255C3	4,8	5,5
C0255E6	3,7	4,4
C0255E10	4,8	>5,6
C0256B1	5,0	>5,6
C0256G11	4,9	5,5
C0256H4	3,6	4,8
C0257C5	3,8	4,6
C0260E11	4,7	5,4
C0260C6	4,6	5,3
C0262C4	4,8	5,3
C0262F11	5,0	5,5
C0263B7	4,1	4,6
C0263G12	4,9	5,6
C0261H2	4,5	5,3
C0264G5	4,9	5,6
C0264G7	4,1	4,8
C0266A11	4,0	4,9

Толерантність до темботріону, дикетонітрилу (активна форма ізоксафлутолу) та мезотріону визначали за допомогою HPLC аналізу. Значення, представлені як pl₅₀. ">", означають, що значення знаходиться поза інтервалом вимірів цього тесту (напр., фермент є чутливішим, ніж значення, наведені після цього).

5

Таблиця 8

HPPD	pl ₅₀ Темботріон	pl ₅₀ Дикетонітрил	pl ₅₀ Мезотріон
	HPLC	HPLC	HPLC
PfHPPD	4,9	4,7	4,7
PfG336W	4,6	4,2	4,3
PfHPPDEvo37	4,1	3,6	н.в.
C023E6	4,3	3,5	н.в.
C024H11	4,8	4,0	н.в.
PfHPPDEvo33	5,2	3,6	н.в.
PfHPPDEvo36	5,2	4,2	н.в.
PfHPPDEvo40	5,0	3,2	н.в.
CO210d10	5,9	3,9	н.в.
CO212f3	4,8	3,8	н.в.
C644	5,5	4,5	5,1
C645	5,2	4,7	5,1
c0218A5	5,0	3,7	4,6
c0216C6	4,8	3,1	4,2
c0213H10	4,5	3,4	4,3
PfHPPDEvo41	4,9	3,4	н.в.
C0228G9	4,6	4,2	4,2

Таблиця 8

HPPD	pl ₅₀ Темботріон	pl ₅₀ Дикетонітрил	pl ₅₀ Мезотріон
C0232D2	н.в.	н.в.	н.в.
C0234A4	5,0	н.в.	н.в.
C0235F6	5,0	н.в.	н.в.
C0235E2	4,9	н.в.	н.в.
C0236H7	5,1	н.в.	н.в.
C0236F8	4,9	н.в.	н.в.
C0240D2	4,8	н.в.	н.в.
C0240D12	4,9	н.в.	н.в.

Як свідчить Таблиця 8, декілька HPPD мутантів виявили підвищену стійкість до кожного темботріону, дикетонітрилу (ізоксафлутол) та мезотріону.

- 5 Толерантність до темботріону, дикетонітрилу та мезотріону відібраних HPPD мутантів була також визначена за допомогою аналізу спряження HPPD (описаний в Прикладі 2). Значення представляють pl₅₀.

Таблиця 9

HPPD	pl ₅₀ Темботріон	pl ₅₀ Дикетонітрил	pl ₅₀ Мезотріон	Km (мкМ)	SEQ ID №:
	HGD	HGD	HGD		
PfHPPD	6,4	5,8	5,8	187	1
PfG336W	6,0	5,3	5,5	141	2
PfHPPDEvo33	6,2	4,6	5,5	581	6
PfHPPDEvo40	6,2	4,2	4,8	509	8
PfHPPDEvo41	5,6	4,2	4,3	336	16

- 10 Як показано в Таблиці 9, HPPD мутанти є більш толерантними до будь-якого HPPD протестованого інгібітора, у порівнянні з HPPD ферментом "дикого типу". Таким чином, цей винахід включає мутантний фермент HPPD, який виявляє істотно покращену стійкість до декількох HPPD інгібіторів в той же час.

- 15 Стійкість до інших HPPD інгібіторів цього класу описана в WO2012/028579 (який включений тут у його повному обсязі шляхом посилання, однак насамперед стосовно сполук, описаних тут в Таблиці 10), однак також була визначена для HPPD ферментів, перелічених в Таблиці 10. Стійкість оцінювали in vitro за допомогою аналізу спряження HPPD (HGD), описаного вище. Значення становили pl₅₀.

Таблиця 10

	pl ₅₀ (HGD аналіз)	
	Сполука №:4-253 як визначено в: WO 2012/028579	Сполука №:4-278 як визначено в: WO 2012/028579
PfG336W	6,2	6,6
PfHPPD	6,4	5,9
PfHPPDEvo40	5,5	6,1
PfHPPDEvo41	5,4	5,6

- 20 Таким чином, відібрані мутанти виявляють стійкість до широкого спектру гербіцидів - HPPD інгібіторів.

Приклад 6. Аналіз толерантності HPPD інгібітора in planta.

- 25 Рослини сої, які експресують фермент, толерантний до HPPD інгібітора цього винаходу, разом з геном, що надає стійкості до гліфосату, та геном, що надає стійкості до до глюфосинату, були протестовані на толерантність до темботріону. Причипний обприскувач DeVries Tracker Sprayer калібрували перед кожним обприскуванням. Хімічною сполукою, яку використовували для тестування темботріону, була композиція LAUDIS® SC. Тестові обприскування були проведені з використанням 184 грамів/гектар; 34,5 % ТВТ. Толерантність оцінювали через тиждень після обприскування. Оцінку "+" ставили рослинам, у яких тканини, що

активно росли, були повністю знебарвлені. Оцінку "+" ставили рослинам, які мали незначну толерантність, тобто, найновіші рослинні тканини були дещо зеленими, а не повністю знебарвленими. Оцінку "+++" ставили рослинам, які виявили дуже легкий вплив від обприскування, тобто, деякий хлороз або було присутнє дуже незначне знебарвлення.

5 Результати цих тестів представлені в Таблиці 11.

Таблиця 11

HPPD	Кількість оброблених рослин	+	++ або +++	Відсоток ++ або +++
PfG336W	2248	811	160	7,12
PfHPPDEvo37	35	17	3	8,57
PfHPPDEvo33	151	50	54	35,76
PfHPPDEvo40	207	60	65	31,4
PfHPPDEvo41	852	412	279	32,75
PfHPPDEvo36	88	47	18	20,45

10 T1 подій, що експресують PfG336W та PfHPPDEvo41 (кожен також експресує ген, який надає стійкості до гліфосату, і ген, який надає стійкості до глюфосинату), оцінювали у польових дослідках. Рослини були обприскані на v2-v3 стадіях 1х глюфосинатом. Через п'ять днів після обробки, рослини, які вижили, були обприскані 2х темботріоном, 2х мезотріоном або 2х ізоксафлутолом; оцінка фітотоксичності була проведена через 7 днів. Дев'ять з-поміж 18 подій, що експресують PfHPPDEvo41, і 0 з-поміж 18 подій, що експресують PfG336W, виявили меншу, або рівну 20 % середню фітотоксичність в результаті післясходового застосування темботріону

15 при 200 г а.і. /га.
У польових дослідженнях в Аргентині, 5 з-поміж 10 T2 PfHPPDEvo41, і 1 з-поміж 3 PfGW336 подій виявили меншу або рівну 18 % максимальну фітотоксичність в результаті післясходового застосування ізоксафлутолу при 210 г а.р. /га.

20 У польових дослідженнях, проведених в США (Міннесота), 7 із 7 T2 PfHPPDEvo41, і 1 із 11 PfGW336 подій виявили меншу або рівну 25 % максимальну фітотоксичність в результаті післясходового застосування темботріону при 200 г а.р. /га.

Приклад 7: Генерування мутантів інших HPPD ферментів.

25 Штами ATX22717 та ATX1974 були ідентифіковані за допомогою аналізу, який зв'язує HPPD активність з утворенням рожевого /жовто-гарячого кольору, який можна виявити візуально. Включення засобів "гасіння" хінону було використано, для того щоб покращити чутливість тесту in vitro. Для "гасіння" хінону було використано MBTH або 3-метил-2-бензотріазолін гідразин. Як фенолоксидази, так і HPPD, є діоксигеназами, які утворюють хінонову сполуку як проміжний продукт; ці хінони після цього зазнають швидких та спонтанних електронних перебудов, які

30 приводить до утворення "даунстрім" продукту, що є більш стійким, такого як меланін (у випадку фенолоксидаз) або гомогентизат (у випадку HPPD), та нерозчинним. При утворенні комплексу з хіноном, MBTH-хіноновий продукт утворює рожевий /жовто-гарячий колір. Додавання MBTH агента, який "гасить", підвищує чутливість тесту приблизно у 5 разів.
Штами вирощували на LB агарі упродовж приблизно 24 годин. Клітини пелетували за допомогою центрифугування, ресуспендували в ½ об'ємі 20mM HEPES буферу, pH 7.1, і лізували за допомогою "бісерного млинка". 50мкл екстракту штаму додавали до 150мкл MBTH тестової суміші у 96-комірковому планшеті з конічним дном. Кінцева тестова суміш містила 10mM MBTH, 0 або 1mM гідроксифеніл пірувату (HPP), 20mM HEPES буферу, pH 7.1, і або 0, 10мкМ, або 1mM темботріону (TBT). 96-комірковий аналітичний планшет струшували після цього

40 при 200об/хв на напольному шейкері, 30 градусах С упродовж приблизно 22 годин перед проведенням підрахунку. Було показано, що штами ATX22717 та ATX1974 є толерантними до TBT.

Штам ATX22717 – це штам *Pseudomonas aeruginosa*, виділений із зразка ґрунту, зібраного в Північній Кароліні, США.

Штам ATX1974 – це штам *Pseudomonas agarici*, виділений із зразка ґрунту, зібраного в

45 Північній Кароліні, США.
Гени HPPD були ідентифіковані серед штамів за допомогою наступних етапів:
- Приготування тотальної ДНК зі штаму. Тотальна ДНК містить як геномну ДНК, так і екстрахромосомну ДНК. Екстрахромосомна ДНК містить суміш деяких або всіх наступних елементів: плазмідів різного розміру; фагові хромосоми; інші неохарактеризовані

50 екстрахромосомні молекули.
- Секвенування ДНК. Тотальна ДНК секвенується із застосуванням методів Next-Generation

Sequencing.

- Збирання послідовності ДНК за допомогою різних пакетів програмного забезпечення, включаючи Newbler, phredPhrapm та CLC.

- Ідентифікація HPPD генів з використанням алгоритмів гомології ДНК та білка.

5 Ахмі305Н було ідентифіковано зі штаму ATX22717. Нуклеотидна послідовність, що кодує Ахмі305Н, наводиться в SEQ ID №:60, а амінокислотна послідовність наводиться в SEQ ID №:57. Ахмі305Н поділяє 99,7 % ідентичності до SEQ ID №:29696 в Опублікованій заявці на Патент США № 20070020624.

10 Ахмі309Н було ідентифіковано зі штаму ATX1974. Нуклеотидна послідовність, що кодує Ахмі309Н, наводиться в SEQ ID №:61, і амінокислотна послідовність наводиться в SEQ ID №:58. Ахмі309Н поділяє 99,7 % ідентичності з GENBANK® Інвентарний № YP_348648.

Штам *Comamonas testosteroni* було відібрано як потенційне джерело для ферментативно сприятливого HPPD, тому що було встановлено, що він продукує піомеланін, похідну сполуку гомогентизинової кислоти, яка є продуктом HPPD активності (Turick et al., 2005, Microbial Metabolite Field Deployment Report. WSRC-TR-2005-00455).

20 Пошук загальнодоступних баз даних BLAST свідчив, що існує дві різні форми HPPD, представлені у видів бактерій *Comamonas testosteroni*, один має 362 амінокислоти у довжину, а інший - 373 амінокислоти завдовжки. Геномна ДНК *Comamonas testosteroni* DNA (ATCC® каталожний номер 700441) була ампліфікована за допомогою ПЛР з використанням праймерів, сконструйованих для обох HPPD генів, виходячи з відомої нуклеотидної послідовності штамів *Comamonas testosteroni* CNB-2, KF-1, і S44, виявлених в базі даних BLAST.

ПЛР продукти були розщеплені за допомогою BspHI та Xba I і клоновані у pSE420, відрізані за допомогою NcoI та XbaI.

25 Нуклеотидна та похідна амінокислотна послідовність HPPD, що має 373 амінокислоти у довжину, не є ідентичною до будь-якої описаної послідовності *Comamonas testosteroni* HPPD, як показано в пошуку BLAST. Вона на 99 % подібна до *Comamonas testosteroni* S44. Ця нова послідовність зараз називається як Ахмі428Н. Нуклеотидна послідовність, що кодує Ахмі428Н, наводиться в SEQ ID №:62, і амінокислотна послідовність наводиться в SEQ ID №:59.

30 Активний HPPD фермент продукуватиме коричневий пігмент, піомеланін, оскільки він конвертує гідроксифенілпіруват до фенілпірувату і до гомогентизинової кислоти. Утворення цього пігмента може бути візуалізовано. Клітини DH5alpha, які експресують Ахмі428Н білок, вирощували до насичення на середовищі LB, а після цього 10мкл насиченої культури наносили на 100мкл LB агарові пластини, що містять 0, 0,5, 1,0 та 2,0мМ темботріону. Лунки фотографували приблизно через 16 годин додаткового вирощування при 37 градусах С.

35 Ахмі428Н також характеризували кінетично за допомогою кінетичного аналізу in vitro, який пов'язує утворення гомогентизинової кислоти з ферментом гомогентизат 1,2-деоксигеназою (HGO). HGO конвертує гомогентизинову кислоту до малеїлацетоацетату, моніторинг якого проводився, оскільки він поглинається строго при 321нм. Моніторинг утворення продукту проводився постійно в режимі реального часу у 96-комірковому планшеті-спектрофотометрі у присутності варіюючих концентрацій субстрату, від лімітуючої до насичуючої, що робило можливим визначення Km ферменту за допомогою стандартної кінетики Міхаеліса-Ментен. Кі може бути визначена за допомогою побудови графіка зміни цього Km у присутності змінних кількостей інгібітора темботріону.

45 Для цього дослідження, Ахмі428Н фермент отримували шляхом вирощування трансформованих DH5alpha клітин струшуванням при 250 об/хв при 37 °C до досягнення культурою OD600, що становила 0,6-0,7. Температуру після цього знижували до 30 °C, а культури продовжували струшувати протягом приблизно 20 годин. Клітинні культури пелетували за допомогою центрифугування та ресуспендували в 1/20 об'ємі 20мМ HEPES, pH 7,0, 50мМ NaCl буферу. Лізис клітин здійснювали додаванням LYSONASE™ (Novagen) протягом 50 45 хв при кімнатній температурі та заморожували при -20 градусах С протягом щонайменше 1 години. Клітинні екстракти розморожували безпосередньо перед тестуванням, освітлювали центрифугуванням та тестували на активність присутності варіюючих рівнів субстрату та інгібітора з надлишком HGO фермента. Аналіз кінетичних даних дав кінетичні константи, наведені в таблиці нижче. Ахмі428Н має подібний рівень толерантності до темботріону, що й мутований PfG336W ген; обидва виявляють вищу толерантність, ніж природний HPPD у сої.

Таблиця 12

Ген	Km HPP (мкМ)	Vmax	Ki TBT (мкМ)
Соєвий HPPD	32,5	79	0,04
W336	152	35	2,49
Axmi428H	52	22,6	1,37

Мутації, представлені в деяких мутантних HPPD ферментах, описаних тут, були інтродуковані у відповідні положення інших нативних HPPD ферментів, включаючи Axmi305H, Axmi309H та Axmi428H з намаганням покращити толерантність цих ферментів.

Таблиця 13 свідчить про ідентичність послідовності між різними HPPD білками. Вирівнювання було виконано за допомогою AlignX.

Таблиця 13

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

Набір для сайт-спрямованого мутагенезу QUIKCHANGE® Lightning був використаний для сайт-спрямованого мутагенезу генів у векторі pSE420. Мутанти, отримані за допомогою цього підходу, трансформували в BI21-DE3* клітинах і вирощували до насичення на LB середовищах. Аліквоти після цього наносили на LB агарові пластини, які містять різні кількості темботріону. Згідно з цим методом, активний HPPD фермент утворює коричневий пігмент через, приблизно, 24 години росту на планшеті. За допомогою цього дослідження було показано, що всі генеровані мутанти мали HPPD активність, яка була значно резистентнішою до інгібування темботріоном.

Визначали толерантність мутантів до темботріону, дикетонітрилу (ізоксафлутолу) та мезотріону, використовуючи метод спряження. Результати, представлені в Таблиці 14 як ">>.", означають, що вони знаходяться поза інтервалом вимірювання, але є значно вищими, ніж числа, наведені нижче.

Таблиця 14

	pl ₅₀ Темботріон	pl ₅₀ Дикетонітрил	pl ₅₀ Мезотріон	Km (мкМ)
PfG336W	6,4	5,8	5,8	187
PfHPPDEvo40	6,2	4,2	4,8	509
PfHPPDEvo41	5,6	4,2	4,3	336
Axmi305H	6,7	6,5	6,7	116
Axmi305H-Evo40	5,8	5,5	5,3	721
Axmi305H-Evo41	6,8	5,0	5,2	816
Axmi309H	6,4	6,4	6,1	318
Axmi309H-Evo40	5,9	4,4	5,2	290
Axmi309H-Evo41	6,2	4,5	4,7	807
Axmi428H	7,2	7,0	6,7	47
Axmi428H-Evo40	6,1	5,2	5,5	1490
Axmi428H-Evo41	5,6	4,3	5	>>1000

Дані, наведені в Таблиці 14, свідчать, що мутації або комбінації мутацій, ідентифікованих тут, є ефективно відповідальними за покращення стійкості до HPPD інгібіторів, незалежно від природи HPPD білка, в який вони вводяться.

Приклад 8. Клонування HPPD генів в рослинних експресійних касетах.

Для кожного HPPD гена, описаного тут, відкрита рамка читування (ORF) може бути ампліфікована за допомогою ПЛР з непроцесованої (повної) матриці ДНК. Сайти рестрикції Hind III можуть бути введені до кожного кінця відкритих рамок читування у процесі ПЛР. Додатково, нуклеотидна послідовність АСС може бути вставлена безпосередньо в 5'-кінці до старт-кодону

гена, для того щоб підвищити ефективність трансляції (Kozak (1987) *Nucleic Acids Research* 15:8125-8148; Joshi (1987) *Nucleic Acids Research* 15:6643-6653). Продукт ПЛР може бути клонований та секвенований за допомогою методик, загальновідомих з рівня техніки, для того щоб пересвідчитись, що в процесі ПЛР не була введена жодна мутація.

Плазмід, яка містить ПЛР-продукт, може бути розщеплена Hind III, а фрагмент, який містить інтактну ВРЗ, може бути виділений. Цей фрагмент може бути клонований в сайт Hind III плазмиди, такої як рAX200, в рослинний експресуючий вектор, який містить промотор актину рису (McElroy et al. (1991) *Molec. Gen. Genet.* 231:150-160) і PinII термінатор (An et al. (1989) *The Plant Cell* 1:115-122). Фрагмент промотор – ген – термінатор із цієї проміжної плазмиди можуть бути після цього субклоновані в плазмід рSB11 (Japan Tobacco, Inc.) для створення остаточної рSB11-основаної плазмиди. Ці рSB11-основані плазмиди типово організовані так, що фрагмент ДНК, який містить конструкцію промотор – ген – термінатор може бути вирізаний в результаті подвійного розщеплення за допомогою ферментів рестрикції, таких як Kpn I та Pme I, і використані для трансформації в рослинах за допомогою аерозольної ін'єкції (aerosol beam injection). Структура отриманих клонів, основаних на рSB11, може бути верифікована шляхом рестрикційного розщеплення та гель-електрофорезу, і за допомогою секвенування через різні клонуючі з'єднання.

Плазмід може бути перенесена в штам *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, який також несе плазмід рSB1 (Japan Tobacco, Inc.), з використанням методики трипарентального схрещування, загальновідомої в галузі, і висаджуванням на середовища, які містять спектиноміцин. Клон на основі рSB11 плазмиди несе ген стійкості до спектиноміцину, однак плазмід має вузький спектр господарів і не може бути реплікована в *Agrobacterium*. Резистентні до спектиноміцину колонії виникають, коли плазмиди на основі рSB11 інтегрують в плазмід рSB1 із широким колом господарів, шляхом гомологічної рекомбінації. Коінтегрований продукт рSB1 і плазмиди на основі рSB11 може бути верифікований за допомогою Саузерн-блот гібридизації. Штам *Agrobacterium*, який несе коінтеграції, може бути використаний для трансформації кукурудзи за допомогою методів, відомих з рівня техніки, таких як, наприклад, метод PureIntro (Japan Tobacco).

Приклад 9. Трансформація сої.

Трансформацію сої здійснюють за допомогою загальновідомих методів, таких як метод *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації з використанням експлантів у вигляді сім'ядолей сої, описаний Paz et al. (2006), *Plant cell Rep.* 25:206. Трансформанти були ідентифіковані з використанням ізоксафлутолу чи темботріону як селективних маркерів. Була відмічена поява зелених пагонів, що було відзначено як індикатор стійкості до гербіцидів ізоксафлутолу або темботріону. Стійкі трансгенні пагони виявлятимуть нормальне позеленіння, порівнянне з пагонами сої дикого типу, необробленими ізоксафлутолом чи темботріоном, в той час як пагони сої "дикого типу", оброблені тією ж кількістю ізоксафлутолу чи темботріону, будуть повністю знебарвленими. Це свідчить, що присутність HPPD білка обумовлює стійкість до гербіцидів - інгібіторів HPPD, типу ізоксафлутолу чи темботріону.

Стійкі зелені пагони переносили на середовище для укорінення або прищеплювали. Укорінені рослини повинні бути перенесені до теплиць після періоду акліматизації. Рослини, що містять трансген, після цього обприскуються гербіцидами - HPPD інгібіторами, як, наприклад, темботріоном в концентрації 100г а.і./га. Через 10 днів після обробки оцінюються симптоми, викликані застосуванням гербіциду, та порівнюються з симптомами, що спостерігались на рослинах дикого типу за тих же умов.

Приклад 10: Укорінення та селекція рослин бавовника T0.

Трансформація бавовника здійснюється за допомогою загальновідомих в галузі методів, особливо хороший метод описаний в опублікованому Патенті РСТ WO 00/71733. Розмножені рослини переносяться до теплиці. Після періоду акліматизації рослини, які достатньо підросли, обприскуються гербіцидами - HPPD інгібіторами, як, наприклад, темботріоном, еквівалентним 100 г а.і./га, доповненим сульфатом амонію і метиловим ефіром ріпакової олії. Через сім днів після обприскування оцінювали симптоми, які виникли через застосування гербіциду у порівнянні з симптомами, що спостерігались у рослин бавовника "дикого типу", які піддавали тій же обробці за тих же умов.

Приклад 11. Трансформація клітин рослин кукурудзи шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації.

Найкращий час для збору початків - 8-12 днів після запилення. Зародки ізолювали з початків; зародки, розміри яких становили 0,8-1,5 мм, були кращими для використання при трансформації. Зародки розташовували щитком догори на прийнятному інкубаційному середовищі та інкубували протягом ночі при 25 °C у темряві.

Однак, не є необхідним per se інкубувати зародки протягом ночі. Зародки приводять у контакт зі штамом *Agrobacterium*, який містить відповідні вектори, що мають нуклеотидну послідовність цього винаходу для перенесення за допомогою Ті-плазміді протягом приблизно 5-10 хв, і після цього переносять на середовища для співкультивування протягом приблизно 3 днів (25 °С у темряві). Після сумісного культивування, експланти переносять на середовища для відновлювального періоду приблизно на п'ять днів (при 25 °С у темряві). Експланти інкубуються на селективному середовищі протягом до восьми тижнів, залежно від природи та особливостей конкретного селективного середовища, яке використовується. Після періоду селекції, отриманий калюс переноситься на середовище для дозрівання зародків, до того часу, коли спостерігається утворення зрілих соматичних зародків. Отримані зрілі соматичні зародки після цього поміщають за умов низької інтенсивності освітлення та ініціюють процес регенерації, як відомо з рівня техніки. Отримані пагони укорінюють на середовищах для укорінення, а отримані рослини переносять у горщики та розмножують як трансгенні рослини.

Всі публікації та заявки на патент, згадані у цьому описі, свідчать про рівень кваліфікації осіб, що є фахівцями в галузі, якої цей винахід стосується. Всі публікації та заявки на патент, включені тут шляхом посилання тією ж мірою, якби кожна публікація чи заявка на патент була специфічно та індивідуально включена шляхом посилання.

Хоча вищезгаданий винахід був описаний з певними деталями шляхом ілюстрацій та прикладів з метою чіткого розуміння, є очевидним, що певні зміни та модифікації можуть практикуватись в межах формули винаходу, яка додається.

Перелік послідовностей

- 25 <110> БАЙЄР КРОПСАЄНС ЛП
БАЙЄР КРОПСАЄНС АГ
ПОРІ, Фабьєн
ХАЙНРИХС, Фолькер
ЛАНГЕ, Гудрун
30 ЛАБЕР, Бернд
ПІТЕРС, Шеріл
СХОУТЕН, Лаура
- 35 <120> ВАРІАНТИ HRPD ТА СПОСОБИ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ
- <130> 2912939-19973WO01
- <150> 61/766,057
40 <151> 2013-03-15
- <150> 61/790,404
<151> 2013-02-18
- 45 <150> 61/707,037
<151> 2012-09-14
- <160> 77
- 50 <170> патент, версія 3.5
- <210> 1
<211> 358
<212> PRT
55 <213> *Pseudomonas fluorescens*
- <400> 1
- Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe
60 1 5 10 15

	Ile	Glu	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu	
				20					25					30			
5	Ile	Met	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	His	
			35					40					45				
	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Glu	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Asn	Asn	Glu	Pro	Asn	
		50					55					60					
10	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly	
	65					70					75					80	
	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu	
					85					90					95		
15	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu	
				100					105					110			
	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile	
20			115					120					125				
	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr	
		130					135					140					
25	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile	
	145					150					155					160	
	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala	
					165					170					175		
30	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Ala	Arg	Tyr	Phe	Asp	
				180					185					190			
	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
			195					200					205				
35	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
		210					215					220					
	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
40		225				230					235					240	
	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	
					245					250					255		
45	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
				260					265					270			
	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
			275					280					285				
50	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
		290					295					300					
	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
55		305				310					315					320	
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Glu	Gly	
					325					330					335		
60	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	
				340					345					350			

Gly Val Leu Thr Ala Asp
355

5
<210> 2
<211> 358
<212> PRT
<213> штучна послідовність

10
<220>
<223> HPPD мутант - PfG336W

<400> 2

15
Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe
1 5 10 15
Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu
20 20 25 30
Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His
35 40 45
25 Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn
50 55 60
Ser Ile Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly
65 70 75 80
30 Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu
85 90 95
Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Asp Thr Gly Pro Met Glu Leu
100 105 110
35 Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile
115 120 125
40 Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr
130 135 140
Leu Glu Gly Val Glu Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Val Ile
145 150 155 160
45 Asp His Leu Thr His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Val Tyr Trp Ala
165 170 175
Asn Phe Tyr Glu Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Ala Arg Tyr Phe Asp
180 185 190
50 Ile Lys Gly Glu Tyr Thr Gly Leu Thr Ser Lys Ala Met Ser Ala Pro
195 200 205
55 Asp Gly Met Ile Arg Ile Pro Leu Asn Glu Glu Ser Ser Lys Gly Ala
210 215 220
Gly Gln Ile Glu Glu Phe Leu Met Gln Phe Asn Gly Glu Gly Ile Gln
225 230 235 240
60 His Val Ala Phe Leu Thr Asp Asp Leu Val Lys Thr Trp Asp Ala Leu
245 250 255

	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
				260					265					270			
5	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
			275					280					285				
	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
		290					295					300					
10	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
	305					310					315					320	
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Glu	Trp	
15					325					330					335		
	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	
				340					345					350			
20	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp											
			355														
	<210>	3															
25	<211>	358															
	<212>	PRT															
	<213>	штучна послідовність															
	<220>																
30	<223>	HPPD мутант - PfHPPDEvo37															
	<400>	3															
	Met	Ala	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Pro	Met	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Glu	Phe	
35	1			5						10					15		
	Ile	Glu	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu	
				20					25					30			
40	Ile	Met	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	His	
			35					40					45				
	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Glu	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Asn	Asn	Glu	Pro	Asn	
		50					55					60					
45	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly	
	65					70					75					80	
	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu	
50					85					90					95		
	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu	
				100					105					110			
55	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile	
			115					120					125				
	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr	
		130					135					140					
60																	

	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile	
	145					150					155					160	
5	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala	
					165					170					175		
	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Trp	Arg	Tyr	Phe	Asp	
				180					185					190			
10	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
			195					200					205				
	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
		210					215					220					
15	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
	225					230					235					240	
	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	
20					245					250					255		
	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
				260					265					270			
25	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
			275					280					285				
	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
		290					295					300					
30	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
	305					310					315					320	
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Glu	Trp	
35					325					330					335		
	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	
				340					345					350			
40	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp											
			355														
	<210>	4															
45	<211>	358															
	<212>	PRT															
	<213>	штучна послідовність															
	<220>																
50	<223>	HPPD мутант - C0234E6															
	<400>	4															
	Met	Ala	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Pro	Met	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Glu	Phe	
55	1				5					10					15		
	Ile	Glu	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu	
				20					25					30			
60	Ile	Met	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	His	
			35					40					45				

	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Glu	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Asn	Asn	Glu	Pro	Asn	
	50						55					60					
5	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly	
	65					70					75					80	
	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu	
					85					90					95		
10	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu	
				100					105					110			
	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile	
15			115					120					125				
	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr	
		130					135					140					
20	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile	
	145					150					155					160	
	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala	
					165					170					175		
25	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Ala	Arg	Tyr	Phe	Asp	
				180					185					190			
	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
30			195					200						205			
	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
		210					215					220					
35	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
	225					230					235					240	
	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	
					245					250					255		
40	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
				260					265					270			
	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
			275					280					285				
45	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
		290					295					300					
	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
50		305				310					315					320	
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Ser	Trp	
					325					330					335		
55	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	
				340					345					350			
	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp											
			355														
60																	

<210> 5
 <211> 358
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність
 5
 <220>
 <223> HPPD мутант - C024H11
 <400> 5
 10 Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe
 1 5 10 15
 15 Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu
 20 20 25 30
 Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His
 35 40 45
 20 Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn
 50 55 60
 Ser Ile Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly
 65 70 75 80
 25 Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu
 85 90 95
 Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Asp Thr Gly Pro Met Glu Leu
 100 105 110
 30 Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile
 115 120 125
 35 Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr
 130 135 140
 Leu Glu Gly Val Glu Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Val Ile
 145 150 155 160
 40 Asp His Leu Thr His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Val Tyr Trp Ala
 165 170 175
 Asn Phe Tyr Glu Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Ala Arg Tyr Phe Asp
 180 185 190
 45 Ile Lys Gly Glu Tyr Thr Gly Leu Thr Ser Lys Ala Met Ser Ala Pro
 195 200 205
 Asp Gly Met Ile Arg Ile Leu Leu Asn Glu Glu Ser Ser Lys Gly Ala
 210 215 220
 50 Gly Gln Ile Glu Glu Phe Leu Met Gln Phe Asn Gly Glu Gly Ile Gln
 225 230 235 240
 His Val Ala Phe Leu Thr Asp Asp Leu Val Lys Thr Trp Asp Ala Leu
 245 250 255
 Lys Lys Ile Gly Met Arg Phe Met Thr Ala Pro Pro Asp Thr Tyr Tyr
 260 265 270
 60 Glu Met Leu Glu Gly Arg Leu Pro Asp His Gly Glu Pro Val Asp Gln
 275 280 285

	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp
	290						295					300				
5	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val
	305					310					315					320
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Glu	Trp
					325					330					335	
10	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg
				340					345					350		
	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp										
15			355													
	<210>	6														
	<211>	358														
20	<212>	PRT														
	<213>	штучна послідовність														
	<220>															
	<223>	HPPD мутант - PfHPPDEvo33														
25																
	<400>	6														
	Met	Ala	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Pro	Met	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Glu	Phe
	1				5					10					15	
30	Ile	Glu	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu
				20					25					30		
	Ile	Met	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	His
35			35					40					45			
	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Glu	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Asn	Asn	Glu	Pro	Asn
	50						55					60				
40	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly
	65					70					75				80	
	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu
					85					90					95	
45	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu
				100					105					110		
	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile
			115					120					125			
50	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr
		130					135					140				
	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile
55	145					150					155					160
	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala
					165					170					175	
60	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Ala	Arg	Tyr	Phe	Asp
				180					185					190		

Ile Lys Gly Glu Tyr Thr Gly Leu Thr Ser Lys Ala Met Ser Ala Pro
 195 200 205
 5 Asp Gly Met Ile Arg Ile Pro Leu Asn Glu Glu Ser Ser Lys Gly Ala
 210 215 220
 Gly Gln Ile Glu Glu Phe Leu Met Gln Phe Asn Gly Glu Gly Ile Gln
 225 230 235 240
 10 His Val Ala Phe Leu Thr Asp Asp Leu Val Lys Thr Trp Asp Ala Leu
 245 250 255
 Lys Lys Ile Gly Met Arg Phe Met Thr Ala Pro Pro Asp Thr Tyr Tyr
 260 265 270
 15 Glu Met Leu Glu Gly Arg Leu Pro Asp His Gly Glu Pro Val Asp Gln
 275 280 285
 20 Leu Gln Ala Arg Gly Ile Leu Leu Asp Gly Ser Ser Val Glu Gly Asp
 290 295 300
 Lys Arg Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Thr Leu Met Gly Pro Val
 305 310 315 320
 25 Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asp Asp Gly Phe Gly Pro Trp
 325 330 335
 30 Asn Phe Lys Ala Leu Phe Glu Ser Ile Glu Arg Asp Gln Val Arg Arg
 340 345 350
 Gly Val Leu Thr Ala Asp
 355
 35 <210> 7
 <211> 358
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність
 40 <220>
 <223> HPPD мутант - PfHPPDEvo36
 <400> 7
 45 Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe
 1 5 10 15
 Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu
 20 25 30
 50 Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His
 35 40 45
 Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn
 50 55 60
 Ser Ile Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly
 65 70 75 80
 60 Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu
 85 90 95

	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu	
				100					105					110			
5	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile	
			115					120					125				
	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr	
		130					135					140					
10	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile	
	145					150					155					160	
	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala	
					165					170					175		
15	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Ala	Arg	Tyr	Phe	Asp	
				180					185					190			
	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
20			195					200					205				
	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
		210					215					220					
25	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
	225					230				235						240	
	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	
					245					250					255		
30	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
				260					265					270			
	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
35			275					280					285				
	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
		290					295					300					
40	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
	305					310					315					320	
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Ser	Ser	
					325					330					335		
45																	
	Asn	Phe	Thr	Gln	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	
				340					345					350			
50	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp											
			355														
	<210>	8															
55	<211>	358															
	<212>	PRT															
	<213>	штучна послідовність															
	<220>																
60	<223>	HPPD мутант - PfHPPDEvo40															

<400> 8

	Met	Ala	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Pro	Met	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Glu	Phe	
	1				5					10					15		
5	Ile	Glu	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu	
				20					25					30			
	Ile	Met	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	His	
10			35					40					45				
	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Glu	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Asn	Asn	Glu	Pro	Asn	
		50					55					60					
15	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly	
	65					70					75					80	
	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu	
					85					90					95		
20	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu	
				100					105					110			
	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile	
25			115					120					125				
	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr	
		130					135					140					
30	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile	
	145					150					155					160	
	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala	
					165					170					175		
35	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Ala	Arg	Tyr	Phe	Asp	
				180				185						190			
	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
40			195					200					205				
	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
		210					215					220					
45	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
	225					230					235					240	
	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	
					245					250					255		
50	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
				260					265					270			
	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
			275				280						285				
55	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
		290					295					300					
	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
60	305					310					315					320	

5	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Pro	Ser
					325					330					335	
	Asn	Phe	Lys	Glu	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg
				340					345					350		
	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp										
				355												
10	<210>	9														
	<211>	358														
	<212>	PRT														
	<213>	штучна послідовність														
15	<220>															
	<223>	HPPD мутант - CO210d10														
	<400>	9														
20	Met	Ala	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Pro	Met	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Glu	Phe
	1				5					10					15	
25	Ile	Glu	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu
				20					25					30		
	Ile	Met	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	His
			35					40					45			
30	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Glu	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Asn	Asn	Glu	Pro	Asn
		50						55					60			
	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly
	65					70					75					80
35	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu
					85					90					95	
40	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu
				100					105					110		
	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile
			115					120					125			
45	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr
		130					135					140				
	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile
	145					150					155					160
50	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala
					165					170					175	
	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Ala	Arg	Tyr	Phe	Asp
				180					185					190		
55	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro
			195					200					205			
	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala
60		210					215					220				

	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	225	230	235	240
5	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	245	250	255	
	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	260	265	270	
10	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	275	280	285	
	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	290	295	300	
15	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	305	310	315	320
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Pro	Ser	325	330	335	
20	Asn	Phe	Thr	Ala	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	340	345	350	
25	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp											355			
30	<210>	10																		
	<211>	358																		
	<212>	PRT																		
	<213>	штучна послідовність																		
35	<220>																			
	<223>	HPPD мутант - CO212f3																		
	<400>	10																		
40	Met	Ala	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Pro	Met	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Glu	Phe	1	5	10	15
	Ile	Glu	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu	20	25	30	
45	Ile	Met	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	His	35	40	45	
	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Glu	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Asn	Asn	Glu	Pro	Asn	50	55	60	
50	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly	65	70	75	80
	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu	85	90	95	
55	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu	100	105	110	
60	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile	115	120	125	

	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr
	130						135					140				
5	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile
	145					150					155					160
	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala
					165					170					175	
10	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Ala	Arg	Tyr	Phe	Asp
				180					185					190		
	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro
			195					200					205			
15	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala
	210						215					220				
	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln
20	225					230					235					240
	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu
					245					250					255	
25	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr
				260					265					270		
	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln
			275					280					285			
30	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp
	290						295					300				
	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val
35	305					310					315					320
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Gly	Trp
					325					330					335	
40	Asn	Phe	Lys	Val	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg
				340					345					350		
	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp										
			355													
45																
	<210> 11															
	<211> 358															
	<212> PRT															
	<213> штучна послідовність															
50																
	<220>															
	<223> HPPD мутант - C644															
	<400> 11															
55																
	Met	Ala	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Pro	Met	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Glu	Phe
	1				5					10					15	
	Ile	Glu	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu
				20					25					30		
60																

	Ile	Met	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	His	
			35					40					45				
5	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Glu	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Asn	Asn	Glu	Pro	Asn	
		50					55					60					
	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly	
	65					70					75					80	
10	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu	
					85					90					95		
	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu	
				100					105					110			
15	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile	
			115					120					125				
	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr	
20		130					135					140					
	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile	
	145					150					155					160	
25	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala	
					165					170					175		
	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Ala	Arg	Tyr	Phe	Asp	
				180					185					190			
30	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
			195					200					205				
	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
35		210					215					220					
	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
	225					230					235					240	
40	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	
					245					250					255		
	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
				260					265					270			
45	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
			275					280					285				
	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
50		290					295					300					
	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
	305					310					315					320	
55	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Ile	Trp	
					325					330					335		
	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	
				340					345					350			
60																	

Gly Val Leu Thr Ala Asp
355

5 <210> 12
<211> 358
<212> PRT
<213> штучна послідовність

10 <220>
<223> HPPD мутант - C645

<400> 12

15 Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe
1 5 10 15

Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu
20 20 25 30

Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His
35 40 45

Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn
25 50 55 60

Ser Ile Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly
65 70 75 80

30 Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu
85 90 95

Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Asp Thr Gly Pro Met Glu Leu
100 105 110

35 Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile
115 120 125

Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr
40 130 135 140

Leu Glu Gly Val Glu Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Val Ile
145 150 155 160

45 Asp His Leu Thr His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Val Tyr Trp Ala
165 170 175

Asn Phe Tyr Glu Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Ala Arg Tyr Phe Asp
180 185 190

50 Ile Lys Gly Glu Tyr Thr Gly Leu Thr Ser Lys Ala Met Ser Ala Pro
195 200 205

Asp Gly Met Ile Arg Ile Pro Leu Asn Glu Glu Ser Ser Lys Gly Ala
55 210 215 220

Gly Gln Ile Glu Glu Phe Leu Met Gln Phe Asn Gly Glu Gly Ile Gln
225 230 235 240

60 His Val Ala Phe Leu Thr Asp Asp Leu Val Lys Thr Trp Asp Ala Leu
245 250 255

	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr
				260					265					270		
5	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln
			275					280					285			
	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp
		290					295					300				
10	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val
	305					310					315					320
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Ile	Gly
					325					330					335	
15	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg
				340					345					350		
20	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp										
			355													
	<210>	13														
	<211>	358														
25	<212>	PRT														
	<213>	штучна послідовність														
	<220>															
	<223>	HPPD мутант - c0218A5														
30	<400>	13														
	Met	Ala	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Pro	Met	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Glu	Phe
	1				5					10					15	
35	Ile	Glu	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu
				20					25					30		
	Ile	Met	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	His
40			35					40					45			
	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Glu	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Asn	Asn	Glu	Pro	Asn
		50					55					60				
45	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly
	65					70					75					80
	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu
					85					90					95	
50	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu
				100					105					110		
	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile
55			115					120					125			
	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr
		130					135					140				
60	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile
	145					150					155					160

Asp His Leu Thr His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Val Tyr Trp Ala
165 170 175

5 Asn Phe Tyr Glu Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Ala Arg Tyr Phe Asp
180 185 190
Ile Lys Gly Glu Tyr Thr Gly Leu Thr Ser Lys Ala Met Ser Ala Pro
195 200 205

10 Asp Gly Met Ile Arg Ile Pro Leu Asn Glu Glu Ser Ser Lys Gly Ala
210 215 220

Gly Gln Ile Glu Glu Phe Leu Met Gln Phe Asn Gly Glu Gly Ile Gln
225 230 235 240

15 His Val Ala Phe Leu Thr Asp Asp Leu Val Lys Thr Trp Asp Ala Leu
245 250 255

Lys Lys Ile Gly Met Arg Phe Met Thr Ala Pro Pro Asp Thr Tyr Tyr
260 265 270

20 Glu Met Leu Glu Gly Arg Leu Pro Asp His Gly Glu Pro Val Asp Gln
275 280 285

25 Leu Gln Ala Arg Gly Ile Leu Leu Asp Gly Ser Ser Val Glu Gly Asp
290 295 300

Lys Arg Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Thr Leu Met Gly Pro Val
305 310 315 320

30 Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asp Asp Gly Phe Gly Pro Ser
325 330 335

35 Asn Phe Ala Ala Leu Phe Glu Ser Ile Glu Arg Asp Gln Val Arg Arg
340 345 350

Gly Val Leu Thr Ala Asp
355

40
<210> 14
<211> 358
<212> PRT
<213> штучна послідовність

45
<220>
<223> HPPD мутант - C0216C6

<400> 14

50 Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe
1 5 10 15

Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu
20 25 30

55 Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His
35 40 45

60 Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn
50 55 60

	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly	65	70	75	80
5	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu	85	90	95	
	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu	100	105	110	
10	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile	115	120	125	
	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr	130	135	140	
15	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile	145	150	155	160
	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala	165	170	175	
20	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Ala	Arg	Tyr	Phe	Asp	180	185	190	
25	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	195	200	205	
	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	210	215	220	
30	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	225	230	235	240
	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	245	250	255	
35	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	260	265	270	
	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	275	280	285	
40	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	290	295	300	
45	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	305	310	315	320
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Pro	Trp	325	330	335	
50	Asn	Phe	Thr	Ala	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	340	345	350	
55	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp											355			
	<210>	15																		
	<211>	358																		
60	<212>	PRT																		
	<213>	штучна послідовність																		

<220>

<223> HPPD мутант - c0213H10

5 <400> 15

Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe
1 5 10 15

10 Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu
20 25 30
Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His
35 40 45

15 Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn
50 55 60

Ser Ile Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly
65 70 75 80

20 Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu
85 90 95

25 Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Asp Thr Gly Pro Met Glu Leu
100 105 110

Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile
115 120 125

30 Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr
130 135 140

Leu Glu Gly Val Glu Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Val Ile
145 150 155 160

35 Asp His Leu Thr His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Val Tyr Trp Ala
165 170 175

Asn Phe Tyr Glu Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Ala Arg Tyr Phe Asp
180 185 190

Ile Lys Gly Glu Tyr Thr Gly Leu Thr Ser Lys Ala Met Ser Ala Pro
195 200 205

45 Asp Gly Met Ile Arg Ile Pro Leu Asn Glu Glu Ser Ser Lys Gly Ala
210 215 220

Gly Gln Ile Glu Glu Phe Leu Met Gln Phe Asn Gly Glu Gly Ile Gln
225 230 235 240

50 His Val Ala Phe Leu Thr Asp Asp Leu Val Lys Thr Trp Asp Ala Leu
245 250 255

Lys Lys Ile Gly Met Arg Phe Met Thr Ala Pro Pro Asp Thr Tyr Tyr
260 265 270

Glu Met Leu Glu Gly Arg Leu Pro Asp His Gly Glu Pro Val Asp Gln
275 280 285

60 Leu Gln Ala Arg Gly Ile Leu Leu Asp Gly Ser Ser Val Glu Gly Asp
290 295 300

Lys Arg Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Thr Leu Met Gly Pro Val
 305 310 315 320
 5 Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asp Asp Gly Phe Gly His Trp
 325 330 335
 Asn Phe Thr Gln Leu Phe Glu Ser Ile Glu Arg Asp Gln Val Arg Arg
 340 345 350
 10 Gly Val Leu Thr Ala Asp
 355
 15 <210> 16
 <211> 358
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність
 20 <220>
 <223> HPPD мутант - PfHPPDEvo41
 <400> 16
 25 Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe
 1 5 10 15
 Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu
 20 25 30
 30 Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His
 35 40 45
 Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn
 50 55 60
 Ser Ile Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly
 65 70 75 80
 40 Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu
 85 90 95
 Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Asp Thr Gly Pro Met Glu Leu
 100 105 110
 45 Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile
 115 120 125
 Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr
 130 135 140
 50 Leu Glu Gly Val Glu Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Val Ile
 145 150 155 160
 55 Asp His Leu Thr His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Val Tyr Trp Ala
 165 170 175
 Asn Phe Tyr Glu Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Ala Arg Tyr Phe Asp
 180 185 190
 60

Ile Lys Gly Glu Tyr Thr Gly Leu Thr Ser Lys Ala Met Ser Ala Pro
195 200 205

5 Asp Gly Met Ile Arg Ile Pro Leu Asn Glu Glu Ser Ser Lys Gly Ala
210 215 220

Gly Gln Ile Glu Glu Phe Leu Met Gln Phe Asn Gly Glu Gly Ile Gln
225 230 235 240

10 His Val Ala Phe Leu Thr Asp Asp Leu Val Lys Thr Trp Asp Ala Leu
245 250 255

Lys Lys Ile Gly Met Arg Phe Met Thr Ala Pro Pro Asp Thr Tyr Tyr
260 265 270

15 Glu Met Leu Glu Gly Arg Leu Pro Asp His Gly Glu Pro Val Asp Gln
275 280 285

20 Leu Gln Ala Arg Gly Ile Leu Leu Asp Gly Ser Ser Val Glu Gly Asp
290 295 300

Lys Arg Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Thr Leu Met Gly Pro Val
305 310 315 320

25 Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asp Asp Gly Phe Gly Pro Trp
325 330 335

Asn Phe Ala Gln Leu Phe Glu Ser Ile Glu Arg Asp Gln Val Arg Arg
340 345 350

30 Gly Val Leu Thr Ala Asp
355

35 <210> 17
<211> 358
<212> PRT
<213> штучна послідовність

40 <220>
<223> HPPD мутант - C0228G9

<400> 17

45 Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe
1 5 10 15

Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu
20 25 30

50 Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His
35 40 45

Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn
50 55 60

Ser Ile Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly
65 70 75 80

60 Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu
85 90 95

	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu	
				100					105					110			
5	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile	
			115					120					125				
	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr	
		130					135					140					
10																	
	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile	
	145					150					155					160	
15	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala	
					165					170					175		
	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Ala	Arg	Ile	Phe	Asp	
				180					185					190			
20																	
	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
			195					200					205				
	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
		210					215					220					
25																	
	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
	225					230					235					240	
	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	
					245					250					255		
30																	
	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
				260					265					270			
	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
35			275					280					285				
	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
		290					295					300					
40																	
	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
	305					310					315					320	
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Glu	Trp	
					325					330					335		
45																	
	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	
				340					345					350			
	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp											
50			355														
	<210>	18															
	<211>	358															
55	<212>	PRT															
	<213>	штучна послідовність															
	<220>																
	<223>	HPPD мутант - C0232D2															
60																	
	<400>	18															

	Met	Ala	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Pro	Met	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Glu	Phe	
	1				5					10					15		
5	Ile	Glu	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu	
				20					25					30			
	Ile	Met	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	His	
			35					40					45				
10	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Glu	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Asn	Asn	Glu	Pro	Asn	
		50					55					60					
	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly	
15	65					70					75					80	
	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu	
					85					90					95		
20	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu	
				100					105					110			
	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile	
			115					120					125				
25	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr	
		130					135					140					
	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile	
	145					150					155					160	
30	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala	
					165					170					175		
	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Trp	Ser	Tyr	Phe	Asp	
35				180					185					190			
	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
			195					200					205				
40	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
		210					215					220					
	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
	225					230					235					240	
45	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	
					245					250					255		
	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
50				260					265					270			
	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
			275					280					285				
	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
55		290					295					300					
	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
	305					310					315					320	
60	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Glu	Trp	
					325					330					335		

	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	
				340					345					350			
5	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp											
			355														
	<210>	19															
10	<211>	358															
	<212>	PRT															
	<213>	штучна послідовність															
	<220>																
15	<223>	HPPD мутант - C0234A4															
	<400>	19															
	Met	Ala	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Pro	Met	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Glu	Phe	
20	1				5					10					15		
	Ile	Glu	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu	
				20					25					30			
25	Ile	Met	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	His	
			35					40					45				
	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Glu	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Asn	Asn	Glu	Pro	Asn	
		50					55					60					
30	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly	
	65					70					75					80	
	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu	
					85					90					95		
35	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu	
				100					105					110			
	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile	
40			115					120					125				
	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr	
		130					135					140					
45	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile	
		145				150					155					160	
	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala	
					165					170					175		
50	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Ala	Arg	Tyr	Phe	Asp	
				180					185					190			
	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
55			195					200					205				
	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
		210					215					220					
60	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
		225				230					235					240	

His Val Ala Phe Leu Thr Asp Asp Leu Val Lys Thr Trp Asp Ala Leu
 245 250 255
 5 Lys Lys Ile Gly Met Arg Phe Met Thr Ala Pro Pro Asp Thr Tyr Tyr
 260 265 270
 Glu Met Leu Glu Gly Arg Leu Pro Asp His Gly Glu Pro Val Asp Gln
 275 280 285
 10 Leu Gln Ala Arg Gly Ile Leu Leu Asp Gly Ser Ser Val Glu Gly Asp
 290 295 300
 Lys Arg Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Thr Leu Met Gly Pro Val
 305 310 315 320
 Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asp Asp Gly Phe Gly Ala Trp
 325 330 335
 20 Asn Phe Ser Gln Leu Phe Glu Ser Ile Glu Arg Asp Gln Val Arg Arg
 340 345 350
 Gly Val Leu Thr Ala Asp
 355
 25
 <210> 20
 <211> 358
 <212> PRT
 30 <213> штучна послідовність
 <220>
 <223> HPPD мутант - C0235F6
 35 <400> 20
 Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe
 1 5 10 15
 40 Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu
 20 25 30
 Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His
 35 40 45
 45 Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn
 50 55 60
 Ser Ile Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly
 50 65 70 75 80
 Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu
 85 90 95
 55 Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Asp Thr Gly Pro Met Glu Leu
 100 105 110
 Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile
 115 120 125
 60

	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr	
	130						135					140					
5	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile	
	145					150					155					160	
	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala	
					165					170					175		
10	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Ala	Arg	Tyr	Phe	Asp	
				180					185					190			
	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
			195					200					205				
15	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
	210						215					220					
	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
20	225					230					235					240	
	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	
					245					250					255		
25	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
				260					265					270			
	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
			275					280					285				
30	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
		290					295					300					
	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
35	305					310					315					320	
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Ala	Ser	
					325					330					335		
40	Asn	Phe	Ser	Gln	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	
				340						345				350			
	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp											
			355														
45																	
	<210>	21															
	<211>	358															
	<212>	PRT															
50	<213>	штучна послідовність															
	<220>																
	<223>	HPPD мутант - C0235E2															
55	<400>	21															
	Met	Ala	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Pro	Met	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Glu	Phe	
	1				5					10					15		
60	Ile	Glu	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu	
				20					25					30			

	Ile	Met	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	His	
			35					40					45				
5	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Glu	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Asn	Asn	Glu	Pro	Asn	
		50					55					60					
	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly	
	65					70					75					80	
10	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu	
					85					90					95		
	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu	
15				100					105					110			
	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile	
			115					120					125				
20	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr	
		130					135					140					
	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile	
	145					150					155					160	
25	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala	
					165					170					175		
	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Ala	Arg	Tyr	Phe	Asp	
30				180					185					190			
	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
			195					200					205				
35	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
		210					215					220					
	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
	225					230					235					240	
40	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	
					245					250					255		
	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
				260					265					270			
45	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
			275					280					285				
	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
50		290					295					300					
	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
	305					310					315					320	
55	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Ser	Ser	
					325					330					335		
	Asn	Phe	Ser	Gln	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	
				340					345					350			
60																	

Gly Val Leu Thr Ala Asp
355

5 <210> 22
<211> 358
<212> PRT
<213> штучна послідовність

10 <220>
<223> HPPD мутант - C0236H7

<400> 22

15 Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe
1 5 10 15

Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu
20 20 25 30

Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His
35 40 45

Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn
25 50 55 60

Ser Ile Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly
65 70 75 80

30 Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu
85 90 95

Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Asp Thr Gly Pro Met Glu Leu
100 105 110

35 Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile
115 120 125

Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr
40 130 135 140
Leu Glu Gly Val Glu Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Val Ile
145 150 155 160

Asp His Leu Thr His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Val Tyr Trp Ala
45 165 170 175

Asn Phe Tyr Glu Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Ala Arg Tyr Phe Asp
180 185 190

50 Ile Lys Gly Glu Tyr Thr Gly Leu Thr Ser Lys Ala Met Ser Ala Pro
195 200 205

Asp Gly Met Ile Arg Ile Pro Leu Asn Glu Glu Ser Ser Lys Gly Ala
210 215 220

55 Gly Gln Ile Glu Glu Phe Leu Met Gln Phe Asn Gly Glu Gly Ile Gln
225 230 235 240

His Val Ala Phe Leu Thr Asp Asp Leu Val Lys Thr Trp Asp Ala Leu
60 245 250 255

Lys Lys Ile Gly Met Arg Phe Met Thr Ala Pro Pro Asp Thr Tyr Tyr
 260 265 270
 5 Glu Met Leu Glu Gly Arg Leu Pro Asp His Gly Glu Pro Val Asp Gln
 275 280 285
 Leu Gln Ala Arg Gly Ile Leu Leu Asp Gly Ser Ser Val Glu Gly Asp
 290 295 300
 10 Lys Arg Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Thr Leu Met Gly Pro Val
 305 310 315 320
 Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asp Asp Gly Phe Gly Ser Trp
 325 330 335
 15 Asn Phe Lys Glu Leu Phe Glu Ser Ile Glu Arg Asp Gln Val Arg Arg
 340 345 350
 Gly Val Leu Thr Ala Asp
 355
 20
 <210> 23
 <211> 358
 <212> PRT
 25 <213> штучна послідовність
 <220>
 <223> HPPD мутант - C0236F8
 30 <400> 23
 Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe
 1 5 10 15
 35 Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu
 20 25 30
 Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His
 35 40 45
 40 Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn
 50 55 60
 Ser Ile Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly
 65 70 75 80
 45 Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu
 85 90 95
 Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Asp Thr Gly Pro Met Glu Leu
 100 105 110
 50 Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile
 115 120 125
 55 Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr
 130 135 140
 Leu Glu Gly Val Glu Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Val Ile
 145 150 155 160
 60

	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala	
					165					170					175		
5	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Ala	Arg	Tyr	Phe	Asp	
				180					185					190			
	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
			195					200					205				
10	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
		210					215					220					
	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
	225					230					235					240	
15	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	
					245					250					255		
	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
20				260					265					270			
	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
			275					280					285				
25	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
		290					295					300					
	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
	305					310					315					320	
30	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Ala	Ser	
					325					330					335		
	Asn	Phe	Thr	Gln	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	
35				340					345					350			
	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp											
			355														
40																	
	<210>	24															
	<211>	358															
	<212>	PRT															
	<213>	штучна послідовність															
45																	
	<220>																
	<223>	HPPD мутант - C0240D2															
	<400>	24															
50	Met	Ala	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Pro	Met	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Glu	Phe	
	1				5					10					15		
	Ile	Glu	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu	
55				20					25					30			
	Ile	Met	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	His	
			35					40					45				
60	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Glu	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Asn	Asn	Glu	Pro	Asn	
		50					55					60					

	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly	65	70	75	80
5	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu	85	90	95	
	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu	100	105	110	
10	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile	115	120	125	
	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr	130	135	140	
15	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile	145	150	155	160
	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala	165	170	175	
	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Ala	Arg	Tyr	Phe	Asp	180	185	190	
25	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	195	200	205	
	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	210	215	220	
30	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	225	230	235	240
	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	245	250	255	
	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	260	265	270	
40	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	275	280	285	
	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	290	295	300	
45	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	305	310	315	320
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Ala	Trp	325	330	335	
50	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	340	345	350	
55	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp											355			
60	<210>	25																		
	<211>	358																		

<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>

5 <223> HPPD мутант - C0240D12

<400> 25

10	Met	Ala	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Pro	Met	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Glu	Phe
	1				5					10					15	
	Ile	Glu	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu
				20					25					30		
15	Ile	Met	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	His
			35					40					45			
	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Glu	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Asn	Asn	Glu	Pro	Asn
		50					55					60				
20	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly
	65					70					75					80
	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu
25					85					90					95	
	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu
				100					105					110		
30	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile
			115					120					125			
	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr
		130					135					140				
35	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile
	145					150					155					160
	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala
40					165					170					175	
	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Ala	Arg	Tyr	Phe	Asp
				180					185					190		
45	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro
			195					200					205			
	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala
		210					215					220				
50	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln
	225					230					235					240
	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu
				245					250						255	
55	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr
				260					265					270		
	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln
60			275					280					285			

Leu Gln Ala Arg Gly Ile Leu Leu Asp Gly Ser Ser Val Glu Gly Asp
 290 295 300
 5 Lys Arg Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Thr Leu Met Gly Pro Val
 305 310 315 320
 Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asp Asp Gly Phe Gly Ser Ser
 325 330 335
 10 Asn Phe Thr Glu Leu Phe Glu Ser Ile Glu Arg Asp Gln Val Arg Arg
 340 345 350
 Gly Val Leu Thr Ala Asp
 355
 15
 <210> 26
 <211> 358
 <212> PRT
 20 <213> штучна послідовність
 <220>
 <223> HPPD мутант - C0242D4
 25 <400> 26
 Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe
 1 5 10 15
 30 Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu
 20 25 30
 Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His
 35 40 45
 35 Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn
 50 55 60
 Ser Ile Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly
 65 70 75 80
 40 Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu
 85 90 95
 Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Asp Thr Gly Pro Met Glu Leu
 100 105 110
 45 Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile
 115 120 125
 50 Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr
 130 135 140
 Leu Glu Gly Val Glu Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Val Ile
 145 150 155 160
 55 Asp His Leu Thr His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Val Tyr Trp Ala
 165 170 175
 Asn Phe Tyr Glu Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Ala Arg Tyr Phe Asp
 180 185 190
 60

	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
			195					200					205				
5	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
		210					215					220					
	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
	225					230					235					240	
10	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	
				245						250					255		
	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
			260						265					270			
15	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
			275					280					285				
20	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
		290					295					300					
	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
	305					310					315					320	
25	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Pro	Ser	
				325						330					335		
	Asn	Phe	Lys	Gln	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	
			340						345					350			
30	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp											
			355														
35	<210>	27															
	<211>	358															
	<212>	PRT															
	<213>	штучна послідовність															
40	<220>																
	<223>	HPPD мутант - C0244A2															
	<400>	27															
45	Met	Ala	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Pro	Met	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Glu	Phe	
	1			5						10					15		
	Ile	Glu	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu	
			20						25					30			
50	Ile	Met	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	His	
		35						40					45				
	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Glu	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Asn	Asn	Glu	Pro	Asn	
55		50					55					60					
	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly	
	65					70					75					80	
60	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu	
				85						90					95		

	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu	
				100					105					110			
5	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile	
			115					120					125				
	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr	
		130					135					140					
10	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile	
	145					150					155					160	
	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala	
					165					170					175		
15	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Gly	Cys	Tyr	Phe	Asp	
				180					185					190			
	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
20			195					200					205				
	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
		210					215					220					
25	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
	225					230				235						240	
	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	
					245					250					255		
30	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
				260					265					270			
	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
35			275					280					285				
	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
		290					295					300					
40	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
	305					310					315					320	
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Pro	Ser	
					325					330					335		
45	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	
				340					345					350			
	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp											
50			355														
	<210>	28															
	<211>	358															
55	<212>	PRT															
	<213>	штучна послідовність															
	<220>																
	<223>	HPPD мутант - C0244F5															
60	<400>	28															

	Met	Ala	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Pro	Met	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Glu	Phe	
	1				5					10					15		
5	Ile	Glu	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu	
				20					25					30			
	Ile	Met	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	His	
			35					40					45				
10	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Glu	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Asn	Asn	Glu	Pro	Asn	
		50					55					60					
	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly	
	65					70					75					80	
15	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu	
					85					90					95		
	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu	
20				100					105					110			
	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile	
			115					120					125				
25	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr	
		130					135					140					
	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile	
	145					150					155					160	
30	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala	
					165					170					175		
	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Gly	Arg	Tyr	Phe	Asp	
35				180					185					190			
	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
			195					200					205				
40	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
		210					215					220					
	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
	225					230					235					240	
45	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	
					245					250					255		
	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
				260					265					270			
50	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
			275					280					285				
	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
55			290				295					300					
	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
	305					310					315					320	
60	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Pro	Ser	
					325					330					335		

Asn Phe Thr Ala Leu Phe Glu Ser Ile Glu Arg Asp Gln Val Arg Arg
340 345 350

5 Gly Val Leu Thr Ala Asp
355

<210> 29
10 <211> 358
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
15 <223> HPPD мутант - C0247B6

<400> 29

20 Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe
1 5 10 15

Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu
20 25 30

25 Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His
35 40 45

Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn
50 55 60

30 Ser Ile Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly
65 70 75 80

35 Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu
85 90 95

Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Asp Thr Gly Pro Met Glu Leu
100 105 110

40 Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile
115 120 125

Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr
130 135 140

45 Leu Glu Gly Val Glu Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Val Ile
145 150 155 160

Asp His Leu Thr His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Val Tyr Trp Ala
165 170 175

50 Asn Phe Tyr Glu Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Ser Arg Tyr Phe Asp
180 185 190

Ile Lys Gly Glu Tyr Thr Gly Leu Thr Ser Lys Ala Met Ser Ala Pro
195 200 205

Asp Gly Met Ile Arg Ile Pro Leu Asn Glu Glu Ser Ser Lys Gly Ala
210 215 220

60 Gly Gln Ile Glu Glu Phe Leu Met Gln Phe Asn Gly Glu Gly Ile Gln
225 230 235 240

His Val Ala Phe Leu Thr Asp Asp Leu Val Lys Thr Trp Asp Ala Leu
 245 250 255
 5 Lys Lys Ile Gly Met Arg Phe Met Thr Ala Pro Pro Asp Thr Tyr Tyr
 260 265 270
 Glu Met Leu Glu Gly Arg Leu Pro Asp His Gly Glu Pro Val Asp Gln
 275 280 285
 10 Leu Gln Ala Arg Gly Ile Leu Leu Asp Gly Ser Ser Val Glu Gly Asp
 290 295 300
 Lys Arg Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Thr Leu Met Gly Pro Val
 305 310 315 320
 15 Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asp Asp Gly Phe Gly Gln Ser
 325 330 335
 Asn Phe Lys Glu Leu Phe Glu Ser Ile Glu Arg Asp Gln Val Arg Arg
 340 345 350
 20 Gly Val Leu Thr Ala Asp
 355
 25 <210> 30
 <211> 358
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність
 30 <220>
 <223> HPPD мутант - C0247H7
 <400> 30
 35 Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe
 1 5 10 15
 Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu
 40 20 25 30
 Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His
 35 40 45
 45 Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn
 50 55 60
 Ser Ile Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly
 65 70 75 80
 50 Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu
 85 90 95
 Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Asp Thr Gly Pro Met Glu Leu
 55 100 105 110
 Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile
 115 120 125
 60 Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr
 130 135 140

	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile	
	145					150					155					160	
5	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala	
					165					170					175		
	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Trp	Ser	Tyr	Phe	Asp	
				180					185					190			
10	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
			195					200					205				
	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
		210					215					220					
15	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
	225					230					235					240	
	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	
20					245					250					255		
	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
				260					265					270			
25	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
			275					280					285				
	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
		290					295					300					
30	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
	305					310					315					320	
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Ser	Ser	
					325					330					335		
35	Asn	Phe	Thr	Glu	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	
				340					345					350			
40	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp											
			355														
	<210>	31															
	<211>	358															
45	<212>	PRT															
	<213>	штучна послідовність															
	<220>																
	<223>	HPPD мутант - C0252F11															
50	<400>	31															
	Met	Ala	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Pro	Met	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Glu	Phe	
	1				5					10					15		
55	Ile	Glu	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu	
				20					25					30			
60	Ile	Met	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	His	
			35					40					45				

	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Glu	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Asn	Asn	Glu	Pro	Asn	
	50						55					60					
5	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly	
	65					70					75					80	
	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu	
					85					90					95		
10	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu	
				100					105					110			
	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile	
			115					120					125				
15	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr	
		130					135					140					
	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile	
20		145				150					155					160	
	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala	
					165					170					175		
25	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Ser	Cys	Tyr	Phe	Asp	
				180					185					190			
	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
			195					200					205				
30	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
		210					215					220					
	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
		225				230					235					240	
35	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	
					245					250					255		
	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
40				260					265					270			
	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
			275					280					285				
45	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
		290					295					300					
	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
		305				310					315					320	
50	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Pro	Trp	
					325					330					335		
	Asn	Phe	Thr	Gln	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	
				340					345					350			
55	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp											
			355														
60	<210>	32															
	<211>	358															
	<212>	PRT															

<213> штучна послідовність

<220>

<223> HPPD мутант - C0255B12

5

<400> 32

	Met	Ala	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Pro	Met	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Glu	Phe
	1				5					10					15	
10	Ile	Glu	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu
				20					25					30		
	Ile	Met	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	His
			35					40					45			
15	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Glu	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Asn	Asn	Glu	Pro	Asn
		50					55					60				
	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly
20	65					70					75					80
	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu
					85					90					95	
25	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu
				100					105					110		
	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile
			115					120					125			
30	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr
		130					135					140				
	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile
		145				150					155					160
35	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala
					165					170					175	
	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Trp	Cys	Tyr	Phe	Asp
40				180					185					190		
	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro
			195					200					205			
45	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala
		210					215					220				
	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln
		225				230					235					240
50	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu
					245					250					255	
	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr
55				260					265					270		
	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln
			275					280					285			
60	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp
		290					295					300				

Lys Arg Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Thr Leu Met Gly Pro Val
 305 310 315 320
 5 Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asp Asp Gly Phe Gly Pro Ser
 325 330 335
 Asn Phe Lys Gln Leu Phe Glu Ser Ile Glu Arg Asp Gln Val Arg Arg
 340 345 350
 10 Gly Val Leu Thr Ala Asp
 355
 15 <210> 33
 <211> 358
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність
 20 <220>
 <223> HPPD мутант - C0255C1
 <400> 33
 25 Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe
 1 5 10 15
 30 Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu
 20 25 30
 Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His
 35 35 40 45
 35 Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn
 50 55 60
 Ser Ile Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly
 65 70 75 80
 40 Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu
 85 90 95
 45 Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Asp Thr Gly Pro Met Glu Leu
 100 105 110
 Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile
 115 120 125
 50 Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr
 130 135 140
 Leu Glu Gly Val Glu Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Val Ile
 145 150 155 160
 55 Asp His Leu Thr His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Val Tyr Trp Ala
 165 170 175
 60 Asn Phe Tyr Glu Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Gly Cys Tyr Phe Asp
 180 185 190

	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
			195					200					205				
5	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
		210					215					220					
	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
	225					230					235					240	
10	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	
					245					250					255		
	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
				260					265					270			
15	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
			275					280					285				
	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
	290						295					300					
20	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
	305					310					315					320	
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Pro	Ser	
25					325					330					335		
	Asn	Phe	Thr	Glu	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	
				340					345					350			
30	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp											
			355														
	<210>	34															
	<211>	357															
35	<212>	PRT															
	<213>	штучна послідовність															
	<220>																
	<223>	HPPD мутант - C0255C3															
40	<400>	34															
	Met	Ala	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Pro	Met	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Glu	Phe	
	1				5					10					15		
45	Ile	Glu	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu	
				20					25					30			
	Ile	Met	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	His	
			35					40					45				
50	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Glu	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Asn	Asn	Glu	Pro	Asn	
	50						55					60					
	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly	
55	65					70					75					80	
	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu	
					85					90					95		
60	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu	
				100					105					110			

	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile	
			115					120					125				
5	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr	
		130					135					140					
	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile	
	145					150					155					160	
10	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala	
					165					170					175		
	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Ala	Arg	Tyr	Phe	Asp	
				180					185					190			
15	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
			195					200					205				
	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
20		210					215					220					
	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
	225					230					235					240	
25	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	
					245					250					255		
	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
				260					265					270			
30	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
			275					280					285				
	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
35		290					295					300					
	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
	305					310					315					320	
40	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Ser	Ser	
					325					330					335		
	Asn	Phe	Glu	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	Gly	
				340					345					350			
45	Val	Leu	Thr	Ala	Asp												
				355													
50	<210>	35															
	<211>	358															
	<212>	PRT															
	<213>	штучна послідовність															
55	<220>																
	<223>	HPPD мутант - C0255E6															
	<400>	35															
60	Met	Ala	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Pro	Met	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Glu	Phe	
	1				5					10					15		

	Ile	Glu	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu	
				20					25					30			
5	Ile	Met	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	His	
			35					40					45				
	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Glu	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Asn	Asn	Glu	Pro	Asn	
		50					55					60					
10	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly	
	65					70					75					80	
	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu	
15					85					90					95		
	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu	
				100					105					110			
20	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile	
			115					120					125				
	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr	
		130					135					140					
25	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile	
	145					150					155					160	
	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala	
					165					170					175		
30	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Ser	Ser	Tyr	Phe	Asp	
				180					185					190			
	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
35			195					200					205				
	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
		210					215					220					
40	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
	225					230					235					240	
	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	
					245					250					255		
45	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
				260					265					270			
	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
50			275					280					285				
	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
		290					295					300					
55	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
	305					310					315					320	
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Pro	Trp	
					325					330					335		
60																	

Asn Phe Thr Glu Leu Phe Glu Ser Ile Glu Arg Asp Gln Val Arg Arg
340 345 350

5 Gly Val Leu Thr Ala Asp
355

10 <210> 36
<211> 358
<212> PRT
<213> штучна послідовність

15 <220>
<223> HPPD мутант - C0255E10
<400> 36

20 Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe
1 5 10 15

Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu
20 25 30

Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His
35 40 45

25 Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn
50 55 60

30 Ser Ile Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly
65 70 75 80

Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu
85 90 95

35 Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Asp Thr Gly Pro Met Glu Leu
100 105 110

Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile
115 120 125

40 Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr
130 135 140

45 Leu Glu Gly Val Glu Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Val Ile
145 150 155 160

Asp His Leu Thr His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Val Tyr Trp Ala
165 170 175

50 Asn Phe Tyr Glu Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Ser Cys Tyr Phe Asp
180 185 190

Ile Lys Gly Glu Tyr Thr Gly Leu Thr Ser Lys Ala Met Ser Ala Pro
195 200 205

55 Asp Gly Met Ile Arg Ile Pro Leu Asn Glu Glu Ser Ser Lys Gly Ala
210 215 220

60 Gly Gln Ile Glu Glu Phe Leu Met Gln Phe Asn Gly Glu Gly Ile Gln
225 230 235 240

His Val Ala Phe Leu Thr Asp Asp Leu Val Lys Thr Trp Asp Ala Leu
245 250 255

5 Lys Lys Ile Gly Met Arg Phe Met Thr Ala Pro Pro Asp Thr Tyr Tyr
260 265 270

Glu Met Leu Glu Gly Arg Leu Pro Asp His Gly Glu Pro Val Asp Gln
275 280 285

10 Leu Gln Ala Arg Gly Ile Leu Leu Asp Gly Ser Ser Val Glu Gly Asp
290 295 300

Lys Arg Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Thr Leu Met Gly Pro Val
305 310 315 320

15 Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asp Asp Gly Phe Gly Pro Ser
325 330 335

20 Asn Phe Thr Ala Leu Phe Glu Ser Ile Glu Arg Asp Gln Val Arg Arg
340 345 350

Gly Val Leu Thr Ala Asp
355

25 <210> 37
<211> 358
<212> PRT
<213> штучна послідовність

30 <220>
<223> HPPD мутант - C0256B1

<400> 37

35 Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe
1 5 10 15

40 Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu
20 25 30

Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His
35 40 45

45 Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn
50 60

Ser Ile Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly
65 70 75 80

50 Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu
85 90 95

Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Asp Thr Gly Pro Met Glu Leu
100 105 110

55 Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile
115 120 125

60 Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr
130 135 140

	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile	
	145					150					155					160	
5	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala	
					165					170					175		
	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Gly	Cys	Tyr	Phe	Asp	
				180					185					190			
10	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
			195					200					205				
	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
15		210					215					220					
	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
	225					230					235					240	
20	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	
					245					250					255		
	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
				260					265					270			
25	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
			275					280					285				
	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
30		290					295					300					
	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
	305					310					315					320	
35	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Glu	Ser	
					325					330					335		
	Asn	Phe	Thr	Glu	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	
				340					345					350			
40	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp											
			355														
45	<210>	38															
	<211>	358															
	<212>	PRT															
	<213>	штучна послідовність															
50	<220>																
	<223>	HPPD мутант - C0256G11															
	<400>	38															
55	Met	Ala	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Pro	Met	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Glu	Phe	
	1				5					10					15		
	Ile	Glu	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu	
				20					25					30			
60																	

	Ile	Met	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	His	
			35					40					45				
5	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Glu	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Asn	Asn	Glu	Pro	Asn	
		50					55					60					
	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly	
	65					70					75					80	
10	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu	
					85					90					95		
	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu	
				100					105					110			
15	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile	
			115					120					125				
	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr	
	130						135					140					
20	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile	
	145					150					155					160	
	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala	
25					165					170					175		
	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Ser	Ser	Tyr	Phe	Asp	
				180					185					190			
30	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
			195					200					205				
	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
	210						215					220					
35	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
	225					230					235					240	
	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	
					245					250					255		
40	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
				260					265					270			
	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
45			275					280					285				
	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
		290					295					300					
50	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
	305					310					315					320	
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Ser	Ser	
					325					330					335		
55	Asn	Phe	Lys	Gln	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	
				340					345					350			
	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp											
60			355														

<210> 39
 <211> 358
 <212> PRT
 5 <213> штучна послідовність

 <220>
 <223> HPPD мутант - C0256H4

 10 <400> 39

 Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe
 1 5 10 15

 15 Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu
 20 25 30
 Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His
 35 40 45

 20 Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn
 50 55 60

 Ser Ile Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly
 65 70 75 80
 25 Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu
 85 90 95

 Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Asp Thr Gly Pro Met Glu Leu
 100 105 110
 30 Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile
 115 120 125
 Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr
 130 135 140
 35 Leu Glu Gly Val Glu Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Val Ile
 145 150 155 160

 40 Asp His Leu Thr His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Val Tyr Trp Ala
 165 170 175

 Asn Phe Tyr Glu Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Gly Cys Tyr Phe Asp
 180 185 190
 45 Ile Lys Gly Glu Tyr Thr Gly Leu Thr Ser Lys Ala Met Ser Ala Pro
 195 200 205

 Asp Gly Met Ile Arg Ile Pro Leu Asn Glu Glu Ser Ser Lys Gly Ala
 210 215 220
 50 Gly Gln Ile Glu Glu Phe Leu Met Gln Phe Asn Gly Glu Gly Ile Gln
 225 230 235 240

 55 His Val Ala Phe Leu Thr Asp Asp Leu Val Lys Thr Trp Asp Ala Leu
 245 250 255

 Lys Lys Ile Gly Met Arg Phe Met Thr Ala Pro Pro Asp Thr Tyr Tyr
 260 265 270
 60

	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
			275					280					285				
5	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
		290					295					300					
	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
	305					310					315					320	
10	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Pro	Ser	
					325					330					335		
	Asn	Phe	Ser	Glu	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	
				340					345					350			
15	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp											
			355														
20	<210>	40															
	<211>	358															
	<212>	PRT															
	<213>	штучна послідовність															
25	<220>																
	<223>	HPPD мутант - C0257C5															
	<400>	40															
30	Met	Ala	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Pro	Met	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Glu	Phe	
	1				5					10					15		
	Ile	Glu	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu	
				20					25					30			
35	Ile	Met	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	His	
		35						40					45				
	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Glu	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Asn	Asn	Glu	Pro	Asn	
		50					55					60					
40	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly	
	65					70					75					80	
	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu	
45					85					90					95		
	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu	
				100					105					110			
50	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile	
			115					120					125				
	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr	
		130					135					140					
55	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile	
	145					150					155					160	
	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala	
60					165					170					175		

	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Ala	Arg	Tyr	Phe	Asp	
				180					185					190			
5	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
			195					200					205				
	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
		210					215					220					
10	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
	225					230					235					240	
	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	
15				245					250						255		
	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
				260				265						270			
	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
20			275				280					285					
	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
		290					295				300						
25	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
	305					310				315						320	
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Pro	Trp	
30				325					330					335			
	Asn	Phe	Lys	Gln	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	
			340					345					350				
35	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp											
			355														
	<210>	41															
40	<211>	358															
	<212>	PRT															
	<213>	штучна послідовність															
	<220>																
45	<223>	HPPD мутант - C0260E11															
	<400>	41															
	Met	Ala	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Pro	Met	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Glu	Phe	
50	1			5						10				15			
	Ile	Glu	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu	
			20					25					30				
	Ile	Met	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	His	
55		35					40					45					
	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Glu	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Asn	Asn	Glu	Pro	Asn	
		50					55				60						
60	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly	
	65					70				75						80	

	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu	
					85					90					95		
5	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu	
				100					105					110			
	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile	
			115					120					125				
10	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr	
	130						135					140					
	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile	
15	145					150					155					160	
	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala	
					165					170					175		
20	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Gly	Arg	Tyr	Phe	Asp	
				180					185					190			
	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
			195					200					205				
25	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
	210						215					220					
	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
30	225					230					235					240	
	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	
					245					250					255		
35	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
				260					265					270			
	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
			275					280					285				
40	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
		290					295					300					
	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
45	305					310					315					320	
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Ser	Ser	
					325					330					335		
50	Asn	Phe	Thr	Glu	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	
				340					345					350			
	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp											
			355														
55																	
	<210>	42															
	<211>	358															
	<212>	PRT															
60	<213>	штучна послідовність															

<220>

<223> HPPD мутант - C0260C6

<400> 42

5 Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe
1 5 10 15

10 Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu
20 25 30

Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His
35 40 45

15 Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn
50 55 60

Ser Ile Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly
65 70 75 80

20 Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu
85 90 95

25 Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Asp Thr Gly Pro Met Glu Leu
100 105 110

Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile
115 120 125

30 Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr
130 135 140

Leu Glu Gly Val Glu Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Val Ile
145 150 155 160

35 Asp His Leu Thr His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Val Tyr Trp Ala
165 170 175

Asn Phe Tyr Glu Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Ser Ser Tyr Phe Asp
180 185 190

40 Ile Lys Gly Glu Tyr Thr Gly Leu Thr Ser Lys Ala Met Ser Ala Pro
195 200 205

45 Asp Gly Met Ile Arg Ile Pro Leu Asn Glu Glu Ser Ser Lys Gly Ala
210 215 220

Gly Gln Ile Glu Glu Phe Leu Met Gln Phe Asn Gly Glu Gly Ile Gln
225 230 235 240

50 His Val Ala Phe Leu Thr Asp Asp Leu Val Lys Thr Trp Asp Ala Leu
245 250 255

Lys Lys Ile Gly Met Arg Phe Met Thr Ala Pro Pro Asp Thr Tyr Tyr
260 265 270

55 Glu Met Leu Glu Gly Arg Leu Pro Asp His Gly Glu Pro Val Asp Gln
275 280 285

60 Leu Gln Ala Arg Gly Ile Leu Leu Asp Gly Ser Ser Val Glu Gly Asp
290 295 300

Lys Arg Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Thr Leu Met Gly Pro Val
 305 310 315 320
 5 Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asp Asp Gly Phe Gly Ser Ser
 325 330 335
 Asn Phe Thr Glu Leu Phe Glu Ser Ile Glu Arg Asp Gln Val Arg Arg
 340 345 350
 10 Gly Val Leu Thr Ala Asp
 355
 15 <210> 43
 <211> 358
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність
 20 <220>
 <223> HPPD мутант - C0262C4
 <400> 43
 25 Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe
 1 5 10 15
 Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu
 20 25 30
 30 Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His
 35 40 45
 Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn
 50 55 60
 35 Ser Ile Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly
 65 70 75 80
 40 Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu
 85 90 95
 Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Asp Thr Gly Pro Met Glu Leu
 100 105 110
 45 Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile
 115 120 125
 50 Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr
 130 135 140
 Leu Glu Gly Val Glu Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Val Ile
 145 150 155 160
 55 Asp His Leu Thr His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Val Tyr Trp Ala
 165 170 175
 Asn Phe Tyr Glu Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Gly Arg Tyr Phe Asp
 180 185 190
 60

	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
			195					200					205				
5	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
		210					215					220					
	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
	225					230					235					240	
10	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	
					245					250					255		
	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
				260					265					270			
15	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
			275					280					285				
	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
20		290					295					300					
	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
	305					310				315						320	
25	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Glu	Trp	
					325					330					335		
	Asn	Phe	Lys	Gln	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	
				340					345					350			
30	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp											
			355														
35	<210>	44															
	<211>	358															
	<212>	PRT															
	<213>	штучна послідовність															
40	<220>																
	<223>	HPPD мутант - C0262F11															
	<400>	44															
45	Met	Ala	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Pro	Met	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Glu	Phe	
	1				5					10					15		
	Ile	Glu	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu	
				20					25					30			
50	Ile	Met	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	His	
		35						40					45				
	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Glu	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Asn	Asn	Glu	Pro	Asn	
	50						55					60					
55	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly	
	65					70					75					80	
	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu	
60					85					90					95		

	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu	
				100					105					110			
5	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile	
			115					120					125				
	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr	
		130					135					140					
10	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile	
	145					150					155					160	
	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala	
					165					170					175		
15	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Ala	Arg	Tyr	Phe	Asp	
				180					185					190			
	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
20			195					200					205				
	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
		210					215					220					
25	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
	225					230				235						240	
	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	
					245					250					255		
30	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
				260					265					270			
	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
35			275					280					285				
	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
		290					295					300					
40	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
	305					310					315					320	
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Ser	Ser	
					325					330					335		
45	Asn	Phe	Lys	Gln	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	
				340					345					350			
	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp											
50			355														
	<210>	45															
	<211>	358															
55	<212>	PRT															
	<213>	штучна послідовність															
	<220>																
	<223>	HPPD мутант - C0263B7															
60	<400>	45															

	Met	Ala	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Pro	Met	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Glu	Phe	
	1				5					10					15		
5	Ile	Glu	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu	
				20					25					30			
	Ile	Met	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	His	
			35					40					45				
10	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Glu	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Asn	Asn	Glu	Pro	Asn	
		50					55					60					
	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly	
15	65					70					75					80	
	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu	
					85					90					95		
20	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu	
				100					105					110			
	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile	
			115					120					125				
25	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr	
		130					135					140					
	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile	
30	145					150					155					160	
	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala	
					165					170					175		
35	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Ala	Cys	Tyr	Phe	Asp	
				180				185						190			
	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
			195					200					205				
40	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
		210					215					220					
	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
45	225					230					235					240	
	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	
					245					250					255		
50	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
				260					265					270			
	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
			275					280					285				
55	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
		290					295					300					
	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
60	305					310					315					320	

Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asp Asp Gly Phe Gly Pro Trp
325 330 335

5 Asn Phe Thr Gln Leu Phe Glu Ser Ile Glu Arg Asp Gln Val Arg Arg
340 345 350

Gly Val Leu Thr Ala Asp
355

10 <210> 46
<211> 358
<212> PRT
<213> штучна послідовність

15 <220>
<223> HPPD мутант - C0263G12

<400> 46

20 Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe
1 5 10 15

25 Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu
20 25 30

Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His
35 40 45

30 Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn
50 55 60

Ser Ile Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly
65 70 75 80

35 Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu
85 90 95

40 Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Asp Thr Gly Pro Met Glu Leu
100 105 110

Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile
115 120 125

45 Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr
130 135 140

Leu Glu Gly Val Glu Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Val Ile
145 150 155 160

50 Asp His Leu Thr His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Val Tyr Trp Ala
165 170 175

Asn Phe Tyr Glu Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Ala Arg Tyr Phe Asp
180 185 190

Ile Lys Gly Glu Tyr Thr Gly Leu Thr Ser Lys Ala Met Ser Ala Pro
195 200 205

60 Asp Gly Met Ile Arg Ile Pro Leu Asn Glu Glu Ser Ser Lys Gly Ala
210 215 220

Gly Gln Ile Glu Glu Phe Leu Met Gln Phe Asn Gly Glu Gly Ile Gln
 225 230 235 240
 His Val Ala Phe Leu Thr Asp Asp Leu Val Lys Thr Trp Asp Ala Leu
 245 250 255
 5 Lys Lys Ile Gly Met Arg Phe Met Thr Ala Pro Pro Asp Thr Tyr Tyr
 260 265 270
 10 Glu Met Leu Glu Gly Arg Leu Pro Asp His Gly Glu Pro Val Asp Gln
 275 280 285
 Leu Gln Ala Arg Gly Ile Leu Leu Asp Gly Ser Ser Val Glu Gly Asp
 290 295 300
 15 Lys Arg Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Thr Leu Met Gly Pro Val
 305 310 315 320
 Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asp Asp Gly Phe Gly Gln Trp
 325 330 335
 20 Asn Phe Ser Glu Leu Phe Glu Ser Ile Glu Arg Asp Gln Val Arg Arg
 340 345 350
 25 Gly Val Leu Thr Ala Asp
 355
 30 <210> 47
 <211> 358
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність
 <220>
 <223> HPPD мутант - C0261H2
 35 <400> 47
 Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe
 1 5 10 15
 40 Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu
 20 25 30
 Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His
 35 40 45
 Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn
 50 55 60
 50 Ser Ile Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly
 65 70 75 80
 Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu
 85 90 95
 55 Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Asp Thr Gly Pro Met Glu Leu
 100 105 110
 Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile
 115 120 125
 60

	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr
	130						135					140				
	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile
	145					150					155					160
5	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala
					165					170					175	
	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Ala	Arg	Tyr	Phe	Asp
				180					185					190		
10	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro
			195					200					205			
	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala
15		210					215					220				
	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln
	225					230					235					240
20	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu
					245					250					255	
	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr
				260					265					270		
25	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln
			275					280					285			
	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp
30		290					295					300				
	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val
	305					310					315					320
35	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Pro	Ser
					325					330					335	
	Asn	Phe	Ser	Ala	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg
				340					345					350		
40	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp										
			355													
45	<210>	48														
	<211>	358														
	<212>	PRT														
	<213>	штучна послідовність														
50	<220>															
	<223>	HPPD мутант - C0264G5														
	<400>	48														
55	Met	Ala	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Pro	Met	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Glu	Phe
	1				5					10					15	
	Ile	Glu	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu
				20					25					30		
60																

	Ile	Met	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	His	
			35					40					45				
5	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Glu	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Asn	Asn	Glu	Pro	Asn	
		50					55					60					
	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly	
		65				70					75					80	
10	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu	
					85					90					95		
	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu	
				100					105					110			
15	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile	
			115					120					125				
	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Tyr	
		130					135					140					
20	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Ile	
		145				150					155					160	
	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala	
					165					170					175		
25	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Ser	Arg	Tyr	Phe	Asp	
				180					185					190			
	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
30			195					200					205				
	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
		210					215					220					
35	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
		225				230					235					240	
	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	
					245					250					255		
40	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
				260					265					270			
	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
45			275					280					285				
	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
		290					295					300					
50	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
		305				310					315					320	
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Gln	Ser	
					325					330					335		
55	Asn	Phe	Thr	Glu	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	
				340					345					350			
60	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp											
			355														

<210> 49
 <211> 358
 <212> PRT
 5 <213> штучна послідовність

 <220>
 <223> HPPD мутант - C0264G7

 10 <400> 49

 Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe
 1 5 10 15

 15 Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu
 20 25 30

 Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His
 35 40 45
 20 Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn
 50 55 60

 25 Ser Ile Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly
 65 70 75 80

 Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu
 85 90 95

 30 Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Asp Thr Gly Pro Met Glu Leu
 100 105 110

 Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile
 115 120 125
 35 Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr
 130 135 140

 Leu Glu Gly Val Glu Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Val Ile
 145 150 155 160

 Asp His Leu Thr His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Val Tyr Trp Ala
 165 170 175

 45 Asn Phe Tyr Glu Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Ser Arg Tyr Phe Asp
 180 185 190

 Ile Lys Gly Glu Tyr Thr Gly Leu Thr Ser Lys Ala Met Ser Ala Pro
 195 200 205
 50 Asp Gly Met Ile Arg Ile Pro Leu Asn Glu Glu Ser Ser Lys Gly Ala
 210 215 220

 Gly Gln Ile Glu Glu Phe Leu Met Gln Phe Asn Gly Glu Gly Ile Gln
 225 230 235 240

 His Val Ala Phe Leu Thr Asp Asp Leu Val Lys Thr Trp Asp Ala Leu
 245 250 255

 60 Lys Lys Ile Gly Met Arg Phe Met Thr Ala Pro Pro Asp Thr Tyr Tyr
 260 265 270

Glu Met Leu Glu Gly Arg Leu Pro Asp His Gly Glu Pro Val Asp Gln
 275 280 285
 5 Leu Gln Ala Arg Gly Ile Leu Leu Asp Gly Ser Ser Val Glu Gly Asp
 290 295 300
 Lys Arg Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Thr Leu Met Gly Pro Val
 305 310 315 320
 10 Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asp Asp Gly Phe Gly Pro Ser
 325 330 335
 Asn Phe Lys Gln Leu Phe Glu Ser Ile Glu Arg Asp Gln Val Arg Arg
 15 340 345 350
 Gly Val Leu Thr Ala Asp
 355
 20
 <210> 50
 <211> 358
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність
 25
 <220>
 <223> HPPD мутант - C0266A11
 <400> 50
 30
 Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe
 1 5 10 15
 Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu
 35 20 25 30
 Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His
 35 40 45
 40 Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn
 50 55 60
 Ser Ile Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly
 65 70 75 80
 45 Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu
 85 90 95
 Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Asp Thr Gly Pro Met Glu Leu
 50 100 105 110
 Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile
 115 120 125
 55 Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr
 130 135 140
 Leu Glu Gly Val Glu Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Val Ile
 145 150 155 160
 60

	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Val	Tyr	Trp	Ala	
					165					170					175		
5	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Gly	Ser	Tyr	Phe	Asp	
				180					185					190			
	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Ser	Ala	Pro	
			195					200					205				
10	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
		210					215					220					
	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
	225					230					235					240	
15	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	
					245					250					255		
	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
				260					265					270			
20	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
			275					280					285				
	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	
25		290					295					300					
	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
	305					310					315					320	
30	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Pro	Ser	
					325					330					335		
	Asn	Phe	Thr	Gln	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	
				340					345					350			
35	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp											
			355														
40	<210>	51															
	<211>	357															
	<212>	PRT															
	<213>	штучна послідовність															
45	<220>																
	<223>	HPPD мутант - Axmi305H-Evo40															
	<400>	51															
50	Met	Asn	Ala	Val	Ala	Lys	Ile	Glu	Gln	His	Asn	Pro	Ile	Gly	Thr	Asp	
	1				5					10					15		
	Gly	Phe	Glu	Phe	Val	Glu	Phe	Thr	Ala	Pro	Asp	Ala	Lys	Gly	Ile	Glu	
				20					25					30			
55	Gln	Leu	Arg	Gln	Leu	Phe	Asn	Met	Met	Gly	Phe	Thr	Glu	Thr	Ala	Lys	
			35					40					45				
	His	Arg	Ser	Lys	Glu	Val	Phe	Leu	Phe	Gln	Gln	Asn	Asp	Ile	Asn	Ile	
60		50					55					60					

	Val	Leu	Asn	Gly	Ser	Pro	Thr	Gly	His	Val	His	Glu	Phe	Ala	Leu	Lys	
	65					70					75					80	
5	His	Gly	Pro	Ser	Ala	Cys	Ala	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asn	Ala	Ser	
					85					90					95		
	Gln	Ala	Ala	Ala	Tyr	Ala	Glu	Ser	Gln	Gly	Ala	Lys	Leu	Val	Gly	Ser	
				100					105					110			
10	His	Ala	Asn	Phe	Gly	Glu	Leu	Asn	Ile	Pro	Ser	Leu	Glu	Gly	Ile	Gly	
			115					120					125				
	Gly	Ser	Leu	Leu	Tyr	Leu	Val	Asp	Arg	Tyr	Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Tyr	
		130					135					140					
15	Asp	Val	Asp	Phe	Glu	Phe	Ile	Glu	Gly	Arg	Ser	Ala	Asn	Asp	Asn	Ser	
	145					150					155					160	
	Val	Gly	Leu	Thr	Tyr	Ile	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Lys	Arg	Gly	
				165					170						175		
20	Gln	Met	Asp	Val	Trp	Ser	Gly	Phe	Tyr	Glu	Arg	Ile	Ala	Asn	Phe	Arg	
				180					185					190			
	Glu	Ile	Arg	Tyr	Phe	Asp	Ile	Glu	Gly	Lys	Leu	Thr	Gly	Leu	Phe	Ser	
25			195					200					205				
	Arg	Ala	Met	Thr	Ala	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Arg	Ile	Pro	Ile	Asn	Glu	
		210					215					220					
30	Ser	Ala	Asp	Asp	Thr	Ser	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Ile	Arg	Glu	Tyr	His	
						230					235					240	
	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	His	Ile	Ala	Leu	Thr	Thr	Asp	Asp	Ile	Tyr	Ala	
				245						250					255		
35	Thr	Val	Arg	Lys	Leu	Arg	Asp	Asn	Gly	Val	Lys	Phe	Met	Ser	Thr	Pro	
				260					265					270			
	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Glu	Lys	Val	Asp	Thr	Arg	Val	Ala	Gly	His	Gly	Glu	
			275					280					285				
40	Pro	Leu	Glu	Gln	Leu	Arg	Glu	Leu	Asn	Leu	Leu	Ile	Asp	Gly	Ala	Pro	
		290					295					300					
	Gly	Asp	Asp	Gly	Ile	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Thr	Asp	Thr	Val	Ile	Gly	
45	305					310					315					320	
	Pro	Ile	Phe	Phe	Glu	Ile	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asn	Gln	Gly	Phe	Gly	
				325						330					335		
50	Pro	Ser	Asn	Phe	Lys	Glu	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Glu	Asp	Gln	Ile	
				340					345					350			
	Arg	Arg	Gly	Val	Ile												
			355														
55																	
	<210>	52															
	<211>	357															
	<212>	PRT															
60	<213>	штучна послідовність															

<220>

<223> HPPD мутант - Axmi305H-Evo41

<400> 52

5 Met Asn Ala Val Ala Lys Ile Glu Gln His Asn Pro Ile Gly Thr Asp
1 5 10 15

10 Gly Phe Glu Phe Val Glu Phe Thr Ala Pro Asp Ala Lys Gly Ile Glu
20 25 30

Gln Leu Arg Gln Leu Phe Asn Met Met Gly Phe Thr Glu Thr Ala Lys
35 40 45

15 His Arg Ser Lys Glu Val Phe Leu Phe Gln Gln Asn Asp Ile Asn Ile
50 55 60

Val Leu Asn Gly Ser Pro Thr Gly His Val His Glu Phe Ala Leu Lys
65 70 75 80

20 His Gly Pro Ser Ala Cys Ala Met Ala Phe Arg Val Lys Asn Ala Ser
85 90 95

Gln Ala Ala Ala Tyr Ala Glu Ser Gln Gly Ala Lys Leu Val Gly Ser
100 105 110

25 His Ala Asn Phe Gly Glu Leu Asn Ile Pro Ser Leu Glu Gly Ile Gly
115 120 125

Gly Ser Leu Leu Tyr Leu Val Asp Arg Tyr Gly Asp Arg Ser Ile Tyr
130 135 140

30 Asp Val Asp Phe Glu Phe Ile Glu Gly Arg Ser Ala Asn Asp Asn Ser
145 150 155 160

35 Val Gly Leu Thr Tyr Ile Asp His Leu Thr His Asn Val Lys Arg Gly
165 170 175

Gln Met Asp Val Trp Ser Gly Phe Tyr Glu Arg Ile Ala Asn Phe Arg
180 185 190

40 Glu Ile Arg Tyr Phe Asp Ile Glu Gly Lys Leu Thr Gly Leu Phe Ser
195 200 205

Arg Ala Met Thr Ala Pro Cys Gly Lys Ile Arg Ile Pro Ile Asn Glu
210 215 220

45 Ser Ala Asp Asp Thr Ser Gln Ile Glu Glu Phe Ile Arg Glu Tyr His
225 230 235 240

Gly Glu Gly Ile Gln His Ile Ala Leu Thr Thr Asp Asp Ile Tyr Ala
245 250 255

50 Thr Val Arg Lys Leu Arg Asp Asn Gly Val Lys Phe Met Ser Thr Pro
260 265 270

55 Asp Thr Tyr Tyr Glu Lys Val Asp Thr Arg Val Ala Gly His Gly Glu
275 280 285

Pro Leu Glu Gln Leu Arg Glu Leu Asn Leu Leu Ile Asp Gly Ala Pro
290 295 300

60

Gly Asp Asp Gly Ile Leu Leu Gln Ile Phe Thr Asp Thr Val Ile Gly
305 310 315 320

5 Pro Ile Phe Phe Glu Ile Ile Gln Arg Lys Gly Asn Gln Gly Phe Gly
325 330 335

Pro Trp Asn Phe Ala Gln Leu Phe Glu Ser Ile Glu Glu Asp Gln Ile
340 345 350

10 Arg Arg Gly Val Ile
355

<210> 53
15 <211> 358
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
20 <223> HPPD мутант - Axmi305H-Evo40

<400> 53
Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe
1 5 10 15

25 Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu
20 25 30

Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His
30 35 40 45

Leu Tyr Arg Gln Gly Ala Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro His
50 55 60

35 Ser Val Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly
65 70 75 80

Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu
85 90 95

40 Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Glu Thr Gly Pro Met Glu Leu
100 105 110

Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile
115 120 125

45 Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Phe
130 135 140

Leu Glu Gly Val Asp Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Ile Ile
50 145 150 155 160

Asp His Leu Thr His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Ala Tyr Trp Ala
165 170 175

55 Asn Phe Tyr Glu Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Ile Arg Tyr Phe Asp
180 185 190

Ile Lys Gly Glu Tyr Thr Gly Leu Thr Ser Lys Ala Met Thr Ala Pro
195 200 205

60

	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
	210						215					220					
5	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
	225					230					235					240	
	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Gln	Leu	
					245					250					255		
10	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
				260					265					270			
	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asn	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
			275					280					285				
15	Leu	Gln	Ser	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ala	Ser	Asp	Lys	Glu	Asp	
	290						295					300					
	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
20	305					310					315					320	
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Pro	Ser	
					325					330					335		
25	Asn	Phe	Lys	Glu	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	
				340					345					350			
	Gly	Val	Leu	Ala	Thr	Glu											
30			355														
	<210>	54															
	<211>	358															
35	<212>	PRT															
	<213>	штучна послідовність															
	<220>																
	<223>	HPPD мутант - Axmi305H-Evo41															
40	<400>	54															
	Met	Ala	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Pro	Met	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Glu	Phe	
	1				5					10					15		
45	Ile	Glu	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu	
				20					25					30			
	Ile	Met	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	His	
50			35					40					45				
	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Ala	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Asn	Asn	Glu	Pro	His	
		50					55					60					
55	Ser	Val	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly	
	65					70					75					80	
	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu	
					85					90					95		
60																	

	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Glu	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu	
				100					105					110			
5	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile	
			115					120					125				
	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Phe	
		130					135					140					
10	Leu	Glu	Gly	Val	Asp	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Ile	Ile	
	145					150					155					160	
	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Ala	Tyr	Trp	Ala	
					165					170					175		
15	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Ile	Arg	Tyr	Phe	Asp	
				180					185					190			
	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Thr	Ala	Pro	
20			195					200					205				
	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
		210					215					220					
25	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
	225					230				235						240	
	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Gln	Leu	
					245					250					255		
30	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
				260					265					270			
	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asn	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
			275					280					285				
35	Leu	Gln	Ser	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ala	Ser	Asp	Lys	Glu	Asp	
		290					295					300					
	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
40	305					310				315						320	
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Pro	Trp	
					325					330					335		
45	Asn	Phe	Ala	Gln	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	
				340					345					350			
	Gly	Val	Leu	Ala	Thr	Glu											
			355														
50																	
	<210>	55															
	<211>	373															
	<212>	PRT															
55	<213>	штучна послідовність															
	<220>																
	<223>	HPPD мутант - Axmi305H-Evo40															
60	<400>	55															

	Met	Asn	Ala	Pro	Leu	Thr	Gln	Ser	Asn	Ala	Ser	Gln	Phe	Gln	Thr	Trp	
	1				5					10					15		
5	Asp	Asn	Pro	Met	Gly	Thr	Asp	Gly	Phe	Glu	Phe	Val	Glu	Tyr	Ala	Ala	
				20					25					30			
	Pro	Asp	Pro	Val	Ala	Met	Gly	Gln	Leu	Phe	Glu	Arg	Met	Gly	Phe	Gln	
			35					40					45				
10	Ala	Ile	Ala	Lys	His	Arg	Arg	Lys	Asn	Val	Thr	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	
		50					55					60					
	Glu	Ile	Asn	Phe	Ile	Ile	Asn	Ala	Glu	Pro	Asp	Ser	Phe	Ala	Gln	Arg	
	65				70						75					80	
15	Phe	Ala	Arg	Leu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Ala	Ile	Ala	Ile	Arg	Val	
				85						90					95		
	Asn	Asp	Ala	Lys	Tyr	Ala	Tyr	Glu	Arg	Ala	Thr	Ser	Leu	Gly	Ala	Trp	
20				100					105					110			
	Gly	Tyr	Ala	Gln	Gln	Ala	Ala	Pro	Gly	Glu	Leu	Ser	Ile	Pro	Ala	Ile	
			115					120					125				
25	Lys	Gly	Ile	Gly	Asp	Ser	Leu	Ile	Tyr	Phe	Ile	Asp	Lys	Trp	Arg	Gly	
		130					135					140					
	Lys	Asn	Gly	Ala	Lys	Asp	Gly	Asp	Leu	Gly	Asn	Ile	Ser	Phe	Phe	Asp	
	145				150						155					160	
30	Val	Asp	Phe	Glu	Pro	Leu	Pro	Gly	Ala	Asp	Leu	His	Pro	Glu	Gly	Leu	
					165					170					175		
	Gly	Leu	Thr	Tyr	Ile	Asp	His	Leu	Thr	Asn	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	
				180					185					190			
35	Met	Ala	Glu	Leu	Ala	Glu	Phe	Tyr	Glu	Arg	Ile	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	
			195					200					205				
	Ile	Arg	Tyr	Phe	Asp	Ile	Glu	Gly	Gln	Ala	Thr	Gly	Val	Lys	Ser	Lys	
40		210					215					220					
	Ala	Met	Thr	Ser	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Arg	Ile	Pro	Ile	Asn	Glu	Glu	
	225					230					235					240	
45	Gly	Asn	Asp	Lys	Ala	Gly	Gln	Ile	Gln	Glu	Tyr	Leu	Asp	Met	Tyr	Arg	
				245						250					255		
	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	His	Ile	Ala	Leu	Gly	Ser	Thr	Asn	Leu	Tyr	Asp	
				260					265					270			
50	Thr	Val	Asp	Gly	Leu	Gln	Met	Asn	Gly	Ile	Lys	Leu	Leu	Asn	Thr	Ser	
			275					280					285				
	Glu	Thr	Tyr	Tyr	Glu	Leu	Leu	Pro	Lys	Arg	Ile	Pro	Asp	Leu	Gln	Glu	
55		290					295					300					
	Pro	Ile	Pro	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Asn	Ile	Leu	Val	Asp	Gly	Gln	Pro	
	305					310					315					320	
60	Gly	Glu	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Asn	Gln	Leu	Gly	Pro	Ile	
					325					330					335		

Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asn Ser Gly Phe Gly Pro Ser
 340 345 350
 5 Asn Phe Lys Glu Leu Phe Glu Thr Met Glu Leu Asp Gln Met Arg Arg
 355 360 365
 Gly Val Leu Lys Thr
 370
 10
 <210> 56
 <211> 373
 <212> PRT
 15 <213> штучна послідовність
 <220>
 <223> HPPD мутант - Axmi305H-Evo41
 20 <400> 56
 Met Asn Ala Pro Leu Thr Gln Ser Asn Ala Ser Gln Phe Gln Thr Trp
 1 5 10 15
 25 Asp Asn Pro Met Gly Thr Asp Gly Phe Glu Phe Val Glu Tyr Ala Ala
 20 25 30
 Pro Asp Pro Val Ala Met Gly Gln Leu Phe Glu Arg Met Gly Phe Gln
 35 40 45
 30 Ala Ile Ala Lys His Arg Arg Lys Asn Val Thr Leu Tyr Arg Gln Gly
 50 55 60
 Glu Ile Asn Phe Ile Ile Asn Ala Glu Pro Asp Ser Phe Ala Gln Arg
 65 70 75 80
 35 Phe Ala Arg Leu His Gly Pro Ser Val Cys Ala Ile Ala Ile Arg Val
 85 90 95
 Asn Asp Ala Lys Tyr Ala Tyr Glu Arg Ala Thr Ser Leu Gly Ala Trp
 100 105 110
 40 Gly Tyr Ala Gln Gln Ala Ala Pro Gly Glu Leu Ser Ile Pro Ala Ile
 115 120 125
 45 Lys Gly Ile Gly Asp Ser Leu Ile Tyr Phe Ile Asp Lys Trp Arg Gly
 130 135 140
 Lys Asn Gly Ala Lys Asp Gly Asp Leu Gly Asn Ile Ser Phe Phe Asp
 145 150 155 160
 50 Val Asp Phe Glu Pro Leu Pro Gly Ala Asp Leu His Pro Glu Gly Leu
 165 170 175
 Gly Leu Thr Tyr Ile Asp His Leu Thr Asn Asn Val Tyr Arg Gly Arg
 180 185 190
 55 Met Ala Glu Leu Ala Glu Phe Tyr Glu Arg Ile Phe Asn Phe Arg Glu
 195 200 205
 60 Ile Arg Tyr Phe Asp Ile Glu Gly Gln Ala Thr Gly Val Lys Ser Lys
 210 215 220

	Ala	Met	Thr	Ser	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Arg	Ile	Pro	Ile	Asn	Glu	Glu	225	230	235	240
5	Gly	Asn	Asp	Lys	Ala	Gly	Gln	Ile	Gln	Glu	Tyr	Leu	Asp	Met	Tyr	Arg	245	250	255	
	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	His	Ile	Ala	Leu	Gly	Ser	Thr	Asn	Leu	Tyr	Asp	260	265	270	
10	Thr	Val	Asp	Gly	Leu	Gln	Met	Asn	Gly	Ile	Lys	Leu	Leu	Asn	Thr	Ser	275	280	285	
	Glu	Thr	Tyr	Tyr	Glu	Leu	Leu	Pro	Lys	Arg	Ile	Pro	Asp	Leu	Gln	Glu	290	295	300	
15	Pro	Ile	Pro	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Asn	Ile	Leu	Val	Asp	Gly	Gln	Pro	305	310	315	320
	Gly	Glu	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Asn	Gln	Leu	Gly	Pro	Ile	325	330	335	
20	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asn	Ser	Gly	Phe	Gly	Pro	Trp	340	345	350	
25	Asn	Phe	Ala	Gln	Leu	Phe	Glu	Thr	Met	Glu	Leu	Asp	Gln	Met	Arg	Arg	355	360	365	
	Gly	Val	Leu	Lys	Thr												370			
30																				
	<210>	57																		
	<211>	357																		
	<212>	PRT																		
35	<213>	Pseudomonas aeruginosa																		
	<400>	57																		
40	Met	Asn	Ala	Val	Ala	Lys	Ile	Glu	Gln	His	Asn	Pro	Ile	Gly	Thr	Asp	1	5	10	15
	Gly	Phe	Glu	Phe	Val	Glu	Phe	Thr	Ala	Pro	Asp	Ala	Lys	Gly	Ile	Glu	20	25	30	
45	Gln	Leu	Arg	Gln	Leu	Phe	Asn	Met	Met	Gly	Phe	Thr	Glu	Thr	Ala	Lys	35	40	45	
	His	Arg	Ser	Lys	Glu	Val	Phe	Leu	Phe	Gln	Gln	Asn	Asp	Ile	Asn	Ile	50	55	60	
50	Val	Leu	Asn	Gly	Ser	Pro	Thr	Gly	His	Val	His	Glu	Phe	Ala	Leu	Lys	65	70	75	80
	His	Gly	Pro	Ser	Ala	Cys	Ala	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asn	Ala	Ser	85	90	95	
55	Gln	Ala	Ala	Ala	Tyr	Ala	Glu	Ser	Gln	Gly	Ala	Lys	Leu	Val	Gly	Ser	100	105	110	
60	His	Ala	Asn	Phe	Gly	Glu	Leu	Asn	Ile	Pro	Ser	Leu	Glu	Gly	Ile	Gly	115	120	125	

	Gly	Ser	Leu	Leu	Tyr	Leu	Val	Asp	Arg	Tyr	Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Tyr	
	130					135					140						
5	Asp	Val	Asp	Phe	Glu	Phe	Ile	Glu	Gly	Arg	Ser	Ala	Asn	Asp	Asn	Ser	
	145					150					155					160	
	Val	Gly	Leu	Thr	Tyr	Ile	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Lys	Arg	Gly	
					165					170					175		
10	Gln	Met	Asp	Val	Trp	Ser	Gly	Phe	Tyr	Glu	Arg	Ile	Ala	Asn	Phe	Arg	
				180					185					190			
	Glu	Ile	Arg	Tyr	Phe	Asp	Ile	Glu	Gly	Lys	Leu	Thr	Gly	Leu	Phe	Ser	
			195					200					205				
15	Arg	Ala	Met	Thr	Ala	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Arg	Ile	Pro	Ile	Asn	Glu	
	210					215					220						
	Ser	Ala	Asp	Asp	Thr	Ser	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Ile	Arg	Glu	Tyr	His	
	225					230					235					240	
20	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	His	Ile	Ala	Leu	Thr	Thr	Asp	Asp	Ile	Tyr	Ala	
					245					250					255		
25	Thr	Val	Arg	Lys	Leu	Arg	Asp	Asn	Gly	Val	Lys	Phe	Met	Ser	Thr	Pro	
				260					265					270			
	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Glu	Lys	Val	Asp	Thr	Arg	Val	Ala	Gly	His	Gly	Glu	
			275					280					285				
30	Pro	Leu	Glu	Gln	Leu	Arg	Glu	Leu	Asn	Leu	Leu	Ile	Asp	Gly	Ala	Pro	
	290					295						300					
	Gly	Asp	Asp	Gly	Ile	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Thr	Asp	Thr	Val	Ile	Gly	
	305					310					315					320	
35	Pro	Ile	Phe	Phe	Glu	Ile	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asn	Gln	Gly	Phe	Gly	
					325					330					335		
40	Glu	Gly	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Glu	Asp	Gln	Ile	
				340					345					350			
	Arg	Arg	Gly	Val	Ile												
			355														
45																	
	<210>	58															
	<211>	358															
	<212>	PRT															
50	<213>	Pseudomonas agarici															
	<400>	58															
55	Met	Ala	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Pro	Met	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Glu	Phe	
	1				5					10					15		
	Ile	Glu	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu	
				20					25					30			
60	Ile	Met	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	His	
			35					40					45				

	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Ala	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Asn	Asn	Glu	Pro	His	
	50						55					60					
5	Ser	Val	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Gly	
	65					70					75					80	
	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu	
					85					90					95		
10	Glu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Ile	His	Ile	Glu	Thr	Gly	Pro	Met	Glu	Leu	
				100					105					110			
	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ile	
15			115					120					125				
	Asp	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Phe	Val	Phe	
		130					135					140					
20	Leu	Glu	Gly	Val	Asp	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Ile	Ile	
	145					150					155					160	
	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg	Met	Ala	Tyr	Trp	Ala	
					165					170					175		
25	Asn	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu	Ile	Arg	Tyr	Phe	Asp	
				180					185					190			
	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Ala	Met	Thr	Ala	Pro	
30			195					200					205				
	Asp	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	
		210					215					220					
35	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	
	225					230					235					240	
	His	Val	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Gln	Leu	
					245					250					255		
40	Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	
				260					265					270			
	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asn	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	
			275					280					285				
45	Leu	Gln	Ser	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ala	Ser	Asp	Lys	Glu	Asp	
		290					295					300					
	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	
50		305				310					315					320	
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Glu	Gly	
					325					330					335		
55	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	
				340					345					350			
	Gly	Val	Leu	Ala	Thr	Glu											
			355														
60																	

<210> 59
 <211> 373
 <212> PRT
 <213> Comamonas testosteroni

5

<400> 59

	Met	Asn	Ala	Pro	Leu	Thr	Gln	Ser	Asn	Ala	Ser	Gln	Phe	Gln	Thr	Trp
	1				5					10					15	
10	Asp	Asn	Pro	Met	Gly	Thr	Asp	Gly	Phe	Glu	Phe	Val	Glu	Tyr	Ala	Ala
				20					25					30		
	Pro	Asp	Pro	Val	Ala	Met	Gly	Gln	Leu	Phe	Glu	Arg	Met	Gly	Phe	Gln
15			35					40					45			
	Ala	Ile	Ala	Lys	His	Arg	Arg	Lys	Asn	Val	Thr	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly
		50					55					60				
20	Glu	Ile	Asn	Phe	Ile	Ile	Asn	Ala	Glu	Pro	Asp	Ser	Phe	Ala	Gln	Arg
	65					70					75					80
	Phe	Ala	Arg	Leu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Ala	Ile	Ala	Ile	Arg	Val
					85					90					95	
25	Asn	Asp	Ala	Lys	Tyr	Ala	Tyr	Glu	Arg	Ala	Thr	Ser	Leu	Gly	Ala	Trp
				100					105					110		
	Gly	Tyr	Ala	Gln	Gln	Ala	Ala	Pro	Gly	Glu	Leu	Ser	Ile	Pro	Ala	Ile
			115					120					125			
30	Lys	Gly	Ile	Gly	Asp	Ser	Leu	Ile	Tyr	Phe	Ile	Asp	Lys	Trp	Arg	Gly
		130					135					140				
	Lys	Asn	Gly	Ala	Lys	Asp	Gly	Asp	Leu	Gly	Asn	Ile	Ser	Phe	Phe	Asp
35	145					150					155					160
	Val	Asp	Phe	Glu	Pro	Leu	Pro	Gly	Ala	Asp	Leu	His	Pro	Glu	Gly	Leu
					165					170					175	
40	Gly	Leu	Thr	Tyr	Ile	Asp	His	Leu	Thr	Asn	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg
				180						185				190		
	Met	Ala	Glu	Leu	Ala	Glu	Phe	Tyr	Glu	Arg	Ile	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu
			195					200					205			
45	Ile	Arg	Tyr	Phe	Asp	Ile	Glu	Gly	Gln	Ala	Thr	Gly	Val	Lys	Ser	Lys
		210					215					220				
	Ala	Met	Thr	Ser	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Arg	Ile	Pro	Ile	Asn	Glu	Glu
	225					230					235					240
50	Gly	Asn	Asp	Lys	Ala	Gly	Gln	Ile	Gln	Glu	Tyr	Leu	Asp	Met	Tyr	Arg
					245					250					255	
	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	His	Ile	Ala	Leu	Gly	Ser	Thr	Asn	Leu	Tyr	Asp
55				260					265					270		
	Thr	Val	Asp	Gly	Leu	Gln	Met	Asn	Gly	Ile	Lys	Leu	Leu	Asn	Thr	Ser
			275					280					285			
60	Glu	Thr	Tyr	Tyr	Glu	Leu	Leu	Pro	Lys	Arg	Ile	Pro	Asp	Leu	Gln	Glu
		290					295					300				

	Pro	Ile	Pro	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Asn	Ile	Leu	Val	Asp	Gly	Gln	Pro	
	305					310					315					320	
5	Gly	Glu	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Asn	Gln	Leu	Gly	Pro	Ile	
					325					330					335		
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asn	Ser	Gly	Phe	Gly	Glu	Gly	
				340					345					350			
10	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Phe	Glu	Thr	Met	Glu	Leu	Asp	Gln	Met	Arg	Arg	
			355					360					365				
	Gly	Val	Leu	Lys	Thr												
15			370														
	<210>	60															
	<211>	1071															
20	<212>	ДНК															
	<213>	Pseudomonas aeruginosa															
	<400>	60															
25	atgaacgccg	tggccaagat	cgaacagcac	aatcccatcg	gtaccgacgg	attcgaattc											60
	gtcgagttca	ccgccccga	cgccaagggc	atcgagcagc	tgcgccagct	gttcaacatg											120
	atgggcttca	ccgaaaccgc	caagcatcgt	tccaaggaag	tcttcctggt	ccagcagaac											180
	gatatcaaca	tcgtgctcaa	cggcagccca	accgggcatg	tccatgaatt	cgccctcaag											240
30	cacggccccg	gcgctgcg	catggccttc	cgggtgaaga	acgcttccca	ggcgcgcgcc											300
	tacgccgaat	cccagggcgc	caagctgggtg	ggcagccacg	ccaacttcgg	cgagctgaac											360
35	atcccttccc	tggaaggcat	cggcgggttcg	ctgctgtatc	ttgtcgaccg	ctacggcgac											420
	cgcagcatct	atgacgtcga	cttcgagttc	atcgaaggcc	gcagcgccaa	cgacaactcg											480
	gtcggcctga	cctacatcga	ccacctcacc	cacaacgtca	agcgcgggcca	gatggacgtc											540
40	tggtccggtt	tctacgagcg	catcgccaac	ttccgcgaga	ttcgctactt	cgacatcgaa											600
	ggcaagctca	ccggcctggt	ctcccgcgcc	atgaccgcac	cttgcgggaa	gatccgcac											660
45	ccgatcaacg	agtcggccga	cgatacctcg	cagatcgagg	aattcatccg	cgaataccat											720
	ggcgaaggca	tccagcacat	cgccctgacc	accgacgaca	tctatgccac	cgtgcgcaag											780
	ctgcgcgaca	acggcggtgaa	gttcatgtcg	accccgga	cctactacga	gaaggctgac											840
50	acccgcgtcg	ccgggcatgg	cgagccgctc	gagcaactgc	gcgaactgaa	cctgctgac											900
	gacggcgccc	cgggcgacga	cggcatcctg	ctgcagatct	tcaccgacac	ggtgatcggc											960
55	ccgatcttct	tcgagatcat	ccagcgcaag	ggcaaccagg	gcttcggcga	gggcaatttc											1020
	aaggccctgt	tcgagtccat	cgaggaagac	cagattcgcc	gcggcgatgat	c											1071
60	<210>	61															
	<211>	1074															

<212> ДНК

<213> *Pseudomonas agarici*

<400> 61

5 atggcagatt tatacgaaaa cccaatgggc ctgatgggct tcgagttcat cgagttcgca 60
tcgccgactc ctggcaccct ggagccgata ttcgagatca tgggcttcac caaggctcgcg 120
10 acccaccgtt ccaagaacgt gcacctgtat cgccagggcg cgatcaacct gatcctcaac 180
aacgaacccc acagcgttgc ttcgtacttc gcggtgaac acggcccgtc cgtttgcggc 240
atggcgttcc gggtaagga ttcgcagaag gcctacaacc gcgcaactgga actcggcgcc 300
15 cagccgatcc acatcgaaac agggccgatg gagctgaacc tgccggcgat caaaggcatt 360
ggcgcgcgcg cgctgtacct gatcgaccgt ttcggcgaag gcagctcgat ctatgacatc 420
gacttcgtgt tcctcgaagg cgttgaccgc aaccgggtcg gtgccggcct gaagatcatc 480
20 gaccacctga cccacaacgt gtatcgcggc cgcatggcct actgggcca cttctacgag 540
aagctgttca acttcgcga gatccgctac ttcgacatca aaggcgaata caccggcctg 600
25 acctcgaaag cgatgaccgc accggacggc atgatccgca tcccgctcaa cgaagaatcg 660
tcgaagggtg ccgggcagat cgaagagttc ctgatgcagt tcaacggcga aggcattccag 720
cacgtggcgt tcctcaccga cgacctggtc aagacctggg atcagttgaa gaagatcggc 780
30 atgcgtttca tgaccgcgcc gccggacacc tactacgaaa tgctcgaagg ccgcctgccg 840
aaccacggcg agccggtgga tcaactgcaa tcgcgcggca tctgtctcga cgggtgcgtcg 900
gataaagaag acaagcgtct gctgctgcag atcttctcgg aaacctgat gggcccggcg 960
35 ttcttcgaat tcatccagcg taaaggcgat gatggtttcg gagaaggcaa cttcaaggct 1020
ctgttcgaat cgatcgagcg tgaccaggtg cgtcgtggcg tgctcgctac cgag 1074

40

<210> 62

<211> 1122

<212> ДНК

<213> *Comamonas testosteroni*

45

<400> 62

atgaacgccc cgttgacca aagcaatgcc agccagttcc agacctggga caaccccatg 60
ggcacggacg gcttcgagtt cgtcgaatac gggccccc atcccggtggc catgggtcag 120
50 ctgttcgagc gcatgggctt tcaggccatt gccaaagcacc gccgcaagaa cgtgaccctg 180
tatcgccagg gcgagatcaa cttcatcatc aatgccgaac ccgacagctt tgcccagcgt 240
55 ttcgcgcgtc tgcacggccc cagcgtctgc gccatcgcca tccgcgtcaa cgacgccaag 300
tacgcctatg agcgcgccac ctgcgtgggt gcctggggct atgcccagca ggccgcccc 360
ggcgaactga gcattcccgc catcaagggc attggcgact ccctgatcta tttcatcgac 420
60 aaatggcgcg gcaagaatgg cgccaaggac ggtgatctcg gcaatatcag cttcttcgac 480

```

gtggacttcg agcctctgcc cggtgccgat ctgcatcccg agggcctggg cctgacctat 540
atcgaccacc tgaccaacaa cgtctaccgc ggccgcatgg ccgagctggc cgagttctac 600
5 gagcgcacat tcaacttcg cgagatccgc tacttcgaca tcgaaggcca ggccacaggc 660
gtcaagagca aggccatgac cagcccctgc ggcaagatcc gcattcccat caacgaggaa 720
10 ggcaacgaca aggccggcca gattcaggag tatctggaca tgtaccgcgg cgaaggcata 780
cagcacatcg cgctgggatc gaccaatctc tacgacaccg tggacggtct gcagatgaac 840
ggcatcaagc tgctgaacac cagcgagacc tattacgagc tgctgcccaa ggcgatcccg 900
15 gacctgcagg aaccattcc cgagctgctg gcgcgcaaca tccttggtga cgccagccc 960
ggcgagctgc tgctgcagat cttcagcgaa aaccagctgg gtcccatctt cttcgagttc 1020
20 atccagcgca agggcaatag cggctttggc gagggcaatt tcaaggcctt gttcgagacc 1080
atggaactcg accagatgcg ccgcggcgtg ctcaagacct ga 1122

```

```

25 <210> 63
    <211> 440
    <212> PRT
    <213> Avena sativa

```

```

30 <400> 63

```

```

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val
1          5          10          15

35 Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn
    20          25          30
Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu
    35          40          45

40 Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu
    50          55          60

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala
65          70          75          80

45 His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr
    85          90          95

Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Ala Thr
100          105          110
Ala Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala
115          120          125

Ala His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala
130          135          140

Ala Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe
145          150          155          160

60 Ala Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu
    165          170          175

```

	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Leu	Arg	Phe	Val	Ser	Tyr	Pro	Asp	Glu	Thr	Asp	
				180					185					190			
5	Leu	Pro	Phe	Leu	Pro	Gly	Phe	Glu	Arg	Val	Ser	Ser	Pro	Gly	Ala	Val	
			195					200					205				
	Asp	Tyr	Gly	Leu	Thr	Arg	Phe	Asp	His	Val	Val	Gly	Asn	Val	Pro	Glu	
		210					215					220					
10	Met	Ala	Pro	Val	Ile	Asp	Tyr	Met	Lys	Gly	Phe	Leu	Gly	Phe	His	Glu	
						230					235					240	
	Phe	Ala	Glu	Phe	Thr	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Thr	Thr	Glu	Ser	Gly	Leu	
15					245					250					255		
	Asn	Ser	Val	Val	Leu	Ala	Asn	Asn	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Leu	Pro	Leu	
				260					265					270			
20	Asn	Glu	Pro	Val	His	Gly	Thr	Lys	Arg	Arg	Ser	Gln	Ile	Gln	Thr	Tyr	
			275					280					285				
	Leu	Glu	Tyr	His	Gly	Gly	Pro	Gly	Val	Gln	His	Ile	Ala	Leu	Ala	Ser	
		290					295					300					
25	Asn	Asp	Val	Leu	Arg	Thr	Leu	Arg	Glu	Met	Arg	Ala	Arg	Thr	Pro	Met	
		305				310					315					320	
	Gly	Gly	Phe	Glu	Phe	Met	Ala	Pro	Pro	Gln	Ala	Lys	Tyr	Tyr	Glu	Gly	
30					325					330					335		
	Val	Arg	Arg	Ile	Ala	Gly	Asp	Val	Leu	Ser	Glu	Glu	Gln	Ile	Lys	Glu	
				340					345					350			
35	Cys	Gln	Glu	Leu	Gly	Val	Leu	Val	Asp	Arg	Asp	Asp	Gln	Gly	Val	Leu	
			355					360					365				
	Leu	Gln	Ile	Phe	Thr	Lys	Pro	Val	Gly	Asp	Arg	Pro	Thr	Phe	Phe	Leu	
		370					375					380					
40	Glu	Met	Ile	Gln	Arg	Ile	Gly	Cys	Met	Glu	Lys	Asp	Glu	Val	Gly	Gln	
		385				390					395					400	
	Glu	Tyr	Gln	Lys	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Phe	Gly	Lys	Gly	Asn	Phe	Ser	
45					405					410					415		
	Glu	Leu	Phe	Lys	Ser	Ile	Glu	Asp	Tyr	Glu	Lys	Ser	Leu	Glu	Val	Lys	
				420					425					430			
50	Gln	Ser	Val	Val	Ala	Gln	Lys	Ser									
			435					440									
	<210>	64															
55	<211>	439															
	<212>	PRT															
	<213>	штучна послідовність															
	<220>																
60	<223>	HPPD мутант - Avena sativum deletion мутант															

<400> 64

	Met	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	
	1				5					10					15		
5	Thr	Pro	Glu	His	Ala	Ala	Arg	Ser	Phe	Pro	Arg	Val	Val	Arg	Val	Asn	
				20					25					30			
	Pro	Arg	Ser	Asp	Arg	Phe	Pro	Val	Leu	Ser	Phe	His	His	Val	Glu	Leu	
10			35					40					45				
	Trp	Cys	Ala	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Gly	Arg	Phe	Ser	Phe	Ala	Leu	
		50					55					60					
15	Gly	Ala	Pro	Leu	Ala	Ala	Arg	Ser	Asp	Leu	Ser	Thr	Gly	Asn	Ser	Ala	
	65				70					75						80	
	His	Ala	Ser	Leu	Leu	Leu	Arg	Ser	Gly	Ala	Leu	Ala	Phe	Leu	Phe	Thr	
				85						90					95		
20	Ala	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro	Pro	Gln	Glu	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	Thr	Ala	
				100					105					110			
	Ser	Ile	Pro	Ser	Phe	Ser	Ala	Asp	Ala	Ala	Arg	Thr	Phe	Ala	Ala	Ala	
25			115					120					125				
	His	Gly	Leu	Ala	Val	Arg	Ser	Val	Gly	Val	Arg	Val	Ala	Asp	Ala	Ala	
		130					135					140					
30	Glu	Ala	Phe	Arg	Val	Ser	Val	Ala	Gly	Gly	Ala	Arg	Pro	Ala	Phe	Ala	
	145				150						155					160	
	Pro	Ala	Asp	Leu	Gly	His	Gly	Phe	Gly	Leu	Ala	Glu	Val	Glu	Leu	Tyr	
				165						170					175		
35	Gly	Asp	Val	Val	Leu	Arg	Phe	Val	Ser	Tyr	Pro	Asp	Glu	Thr	Asp	Leu	
				180					185					190			
	Pro	Phe	Leu	Pro	Gly	Phe	Glu	Arg	Val	Ser	Ser	Pro	Gly	Ala	Val	Asp	
40			195					200					205				
	Tyr	Gly	Leu	Thr	Arg	Phe	Asp	His	Val	Val	Gly	Asn	Val	Pro	Glu	Met	
		210					215					220					
45	Ala	Pro	Val	Ile	Asp	Tyr	Met	Lys	Gly	Phe	Leu	Gly	Phe	His	Glu	Phe	
	225				230						235					240	
	Ala	Glu	Phe	Thr	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Thr	Thr	Glu	Ser	Gly	Leu	Asn	
				245						250					255		
50	Ser	Val	Val	Leu	Ala	Asn	Asn	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Leu	Pro	Leu	Asn	
				260					265					270			
	Glu	Pro	Val	His	Gly	Thr	Lys	Arg	Arg	Ser	Gln	Ile	Gln	Thr	Tyr	Leu	
			275					280					285				
55	Glu	Tyr	His	Gly	Gly	Pro	Gly	Val	Gln	His	Ile	Ala	Leu	Ala	Ser	Asn	
		290					295					300					
	Asp	Val	Leu	Arg	Thr	Leu	Arg	Glu	Met	Arg	Ala	Arg	Thr	Pro	Met	Gly	
60	305					310					315					320	

	Gly	Phe	Glu	Phe	Met	Ala	Pro	Pro	Gln	Ala	Lys	Tyr	Tyr	Glu	Gly	Val	
					325					330					335		
5	Arg	Arg	Ile	Ala	Gly	Asp	Val	Leu	Ser	Glu	Glu	Gln	Ile	Lys	Glu	Cys	
				340					345					350			
	Gln	Glu	Leu	Gly	Val	Leu	Val	Asp	Arg	Asp	Asp	Gln	Gly	Val	Leu	Leu	
			355					360					365				
10	Gln	Ile	Phe	Thr	Lys	Pro	Val	Gly	Asp	Arg	Pro	Thr	Phe	Phe	Leu	Glu	
		370					375					380					
	Met	Ile	Gln	Arg	Ile	Gly	Cys	Met	Glu	Lys	Asp	Glu	Val	Gly	Gln	Glu	
	385					390					395					400	
15	Tyr	Gln	Lys	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Phe	Gly	Lys	Gly	Asn	Phe	Ser	Glu	
				405						410					415		
	Leu	Phe	Lys	Ser	Ile	Glu	Asp	Tyr	Glu	Lys	Ser	Leu	Glu	Val	Lys	Gln	
20				420					425					430			
	Ser	Val	Val	Ala	Gln	Lys	Ser										
			435														
25																	
	<210>	65															
	<211>	444															
	<212>	PRT															
	<213>	Zea mays															
30																	
	<400>	65															
	Met	Gly	Pro	Thr	Pro	Thr	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala	Val	Ala	Ala	
	1				5					10					15		
35	Ala	Ser	Ala	Ala	Glu	Gln	Ala	Ala	Phe	Arg	Leu	Val	Gly	His	Arg	Asn	
			20					25					30				
	Phe	Val	Arg	Phe	Asn	Pro	Arg	Ser	Asp	Arg	Phe	His	Thr	Leu	Ala	Phe	
40			35					40					45				
	His	His	Val	Glu	Leu	Trp	Cys	Ala	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Gly	Arg	
	50						55					60					
45	Phe	Ser	Phe	Gly	Leu	Gly	Ala	Pro	Leu	Ala	Ala	Arg	Ser	Asp	Leu	Ser	
	65				70					75					80		
	Thr	Gly	Asn	Ser	Ala	His	Ala	Ser	Leu	Leu	Leu	Arg	Ser	Gly	Ser	Leu	
				85						90					95		
50	Ser	Phe	Leu	Phe	Thr	Ala	Pro	Tyr	Ala	His	Gly	Ala	Asp	Ala	Ala	Thr	
				100					105					110			
	Ala	Ala	Leu	Pro	Ser	Phe	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Arg	Arg	Phe	Ala	Ala	
55			115					120					125				
	Asp	His	Gly	Leu	Ala	Val	Arg	Ala	Val	Ala	Leu	Arg	Val	Ala	Asp	Ala	
	130						135					140					
	Glu	Asp	Ala	Phe	Arg	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Gly	Ala	Arg	Pro	Ala	Phe	
60	145					150					155					160	

	Gly	Pro	Val	Asp	Leu	Gly	Arg	Gly	Phe	Arg	Leu	Ala	Glu	Val	Glu	Leu	
					165					170					175		
5	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Leu	Arg	Tyr	Val	Ser	Tyr	Pro	Asp	Gly	Ala	Ala	
				180					185					190			
	Gly	Glu	Pro	Phe	Leu	Pro	Gly	Phe	Glu	Gly	Val	Ala	Ser	Pro	Gly	Ala	
			195					200					205				
10	Ala	Asp	Tyr	Gly	Leu	Ser	Arg	Phe	Asp	His	Ile	Val	Gly	Asn	Val	Pro	
		210					215					220					
	Glu	Leu	Ala	Pro	Ala	Ala	Ala	Tyr	Phe	Ala	Gly	Phe	Thr	Gly	Phe	His	
	225					230					235					240	
15	Glu	Phe	Ala	Glu	Phe	Thr	Thr	Glu	Asp	Val	Gly	Thr	Ala	Glu	Ser	Gly	
					245					250					255		
	Leu	Asn	Ser	Met	Val	Leu	Ala	Asn	Asn	Ser	Glu	Asn	Val	Leu	Leu	Pro	
20				260					265					270			
	Leu	Asn	Glu	Pro	Val	His	Gly	Thr	Lys	Arg	Arg	Ser	Gln	Ile	Gln	Thr	
			275					280					285				
25	Phe	Leu	Asp	His	His	Gly	Gly	Pro	Gly	Val	Gln	His	Met	Ala	Leu	Ala	
		290					295					300					
	Ser	Asp	Asp	Val	Leu	Arg	Thr	Leu	Arg	Glu	Met	Gln	Ala	Arg	Ser	Ala	
	305					310					315					320	
30	Met	Gly	Gly	Phe	Glu	Phe	Met	Ala	Pro	Pro	Thr	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Asp	
					325					330					335		
	Gly	Val	Arg	Arg	Arg	Ala	Gly	Asp	Val	Leu	Thr	Glu	Ala	Gln	Ile	Lys	
35				340					345					350			
	Glu	Cys	Gln	Glu	Leu	Gly	Val	Leu	Val	Asp	Arg	Asp	Asp	Gln	Gly	Val	
			355					360					365				
40	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Thr	Lys	Pro	Val	Gly	Asp	Arg	Pro	Thr	Leu	Phe	
		370					375					380					
	Leu	Glu	Ile	Ile	Gln	Arg	Ile	Gly	Cys	Met	Glu	Lys	Asp	Glu	Lys	Gly	
	385					390					395					400	
45	Gln	Glu	Tyr	Gln	Lys	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Phe	Gly	Lys	Gly	Asn	Phe	
					405					410					415		
	Ser	Gln	Leu	Phe	Lys	Ser	Ile	Glu	Asp	Tyr	Glu	Lys	Ser	Leu	Glu	Ala	
50				420					425					430			
	Lys	Gln	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gln	Gly	Ser					
			435					440									
55	<210>	66															
	<211>	445															
	<212>	PRT															
	<213>	Arabidopsis thaliana															
60	<400>	66															

	Met	Gly	His	Gln	Asn	Ala	Ala	Val	Ser	Glu	Asn	Gln	Asn	His	Asp	Asp	
	1				5					10					15		
5	Gly	Ala	Ala	Ser	Ser	Pro	Gly	Phe	Lys	Leu	Val	Gly	Phe	Ser	Lys	Phe	
				20					25					30			
	Val	Arg	Lys	Asn	Pro	Lys	Ser	Asp	Lys	Phe	Lys	Val	Lys	Arg	Phe	His	
			35					40					45				
10	His	Ile	Glu	Phe	Trp	Cys	Gly	Asp	Ala	Thr	Asn	Val	Ala	Arg	Arg	Phe	
		50					55					60					
	Ser	Trp	Gly	Leu	Gly	Met	Arg	Phe	Ser	Ala	Lys	Ser	Asp	Leu	Ser	Thr	
	65					70					75					80	
15	Gly	Asn	Met	Val	His	Ala	Ser	Tyr	Leu	Leu	Thr	Ser	Gly	Asp	Leu	Arg	
					85					90					95		
	Phe	Leu	Phe	Thr	Ala	Pro	Tyr	Ser	Pro	Ser	Leu	Ser	Ala	Gly	Glu	Ile	
20				100					105					110			
	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Ala	Ser	Ile	Pro	Ser	Phe	Asp	His	Gly	Ser	Cys	
			115					120					125				
25	Arg	Ser	Phe	Phe	Ser	Ser	His	Gly	Leu	Gly	Val	Arg	Ala	Val	Ala	Ile	
		130					135					140					
	Glu	Val	Glu	Asp	Ala	Glu	Ser	Ala	Phe	Ser	Ile	Ser	Val	Ala	Asn	Gly	
	145					150					155					160	
30	Ala	Ile	Pro	Ser	Ser	Pro	Pro	Ile	Val	Leu	Asn	Glu	Ala	Val	Thr	Ile	
					165					170					175		
	Ala	Glu	Val	Lys	Leu	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Leu	Arg	Tyr	Val	Ser	Tyr	
35				180					185					190			
	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Glu	Lys	Ser	Glu	Phe	Leu	Pro	Gly	Phe	Glu	Arg	
			195					200					205				
40	Val	Glu	Asp	Ala	Ser	Ser	Phe	Pro	Leu	Asp	Tyr	Gly	Ile	Arg	Arg	Leu	
		210					215					220					
	Asp	His	Ala	Val	Gly	Asn	Val	Pro	Glu	Leu	Gly	Pro	Ala	Leu	Thr	Tyr	
	225					230					235					240	
45	Val	Ala	Gly	Phe	Thr	Gly	Phe	His	Gln	Phe	Ala	Glu	Phe	Thr	Ala	Asp	
					245					250					255		
	Asp	Val	Gly	Thr	Ala	Glu	Ser	Gly	Leu	Asn	Ser	Ala	Val	Leu	Ala	Ser	
50				260					265					270			
	Asn	Asp	Glu	Met	Val	Leu	Leu	Pro	Ile	Asn	Glu	Pro	Val	His	Gly	Thr	
			275					280					285				
55	Lys	Arg	Lys	Ser	Gln	Ile	Gln	Thr	Tyr	Leu	Glu	His	Asn	Glu	Gly	Ala	
		290					295					300					
	Gly	Leu	Gln	His	Leu	Ala	Leu	Met	Ser	Glu	Asp	Ile	Phe	Arg	Thr	Leu	
60		305				310					315					320	

	Arg	Glu	Met	Arg	Lys	Arg	Ser	Ser	Ile	Gly	Gly	Phe	Asp	Phe	Met	Pro	
					325					330					335		
5	Ser	Pro	Pro	Pro	Thr	Tyr	Tyr	Gln	Asn	Leu	Lys	Lys	Arg	Val	Gly	Asp	
				340					345					350			
	Val	Leu	Ser	Asp	Asp	Gln	Ile	Lys	Glu	Cys	Glu	Glu	Leu	Gly	Ile	Leu	
			355					360					365				
10	Val	Asp	Arg	Asp	Asp	Gln	Gly	Thr	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Thr	Lys	Pro	
		370					375					380					
	Leu	Gly	Asp	Arg	Pro	Thr	Ile	Phe	Ile	Glu	Ile	Ile	Gln	Arg	Val	Gly	
15		385				390					395					400	
	Cys	Met	Met	Lys	Asp	Glu	Glu	Gly	Lys	Ala	Tyr	Gln	Ser	Gly	Gly	Cys	
				405						410					415		
20	Gly	Gly	Phe	Gly	Lys	Gly	Asn	Phe	Ser	Glu	Leu	Phe	Lys	Ser	Ile	Glu	
				420					425					430			
	Glu	Tyr	Glu	Lys	Thr	Leu	Glu	Ala	Lys	Gln	Leu	Val	Gly				
			435					440					445				
25																	
	<210>	67															
	<211>	434															
	<212>	PRT															
30	<213>	Hordeum vulgare															
	<400>	67															
35	Met	Pro	Pro	Thr	Pro	Thr	Thr	Pro	Ala	Ala	Thr	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	
	1				5					10					15		
	Val	Thr	Pro	Glu	His	Ala	Arg	Pro	His	Arg	Met	Val	Arg	Phe	Asn	Pro	
				20					25					30			
40	Arg	Ser	Asp	Arg	Phe	His	Thr	Leu	Ser	Phe	His	His	Val	Glu	Phe	Trp	
			35					40					45				
	Cys	Ala	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Gly	Arg	Phe	Ala	Phe	Ala	Leu	Gly	
		50					55					60					
45	Ala	Pro	Leu	Ala	Ala	Arg	Ser	Asp	Leu	Ser	Thr	Gly	Asn	Ser	Ala	His	
		65				70					75					80	
	Ala	Ser	Gln	Leu	Leu	Arg	Ser	Gly	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu	Phe	Thr	Ala	
50					85					90					95		
	Pro	Tyr	Ala	Asn	Gly	Cys	Asp	Ala	Ala	Thr	Ala	Ser	Leu	Pro	Ser	Phe	
				100					105					110			
55	Ser	Ala	Asp	Ala	Ala	Arg	Arg	Phe	Ser	Ala	Asp	His	Gly	Ile	Ala	Val	
			115					120					125				
	Arg	Ser	Val	Ala	Leu	Arg	Val	Ala	Asp	Ala	Ala	Glu	Ala	Phe	Arg	Ala	
		130					135					140					
60																	

	Ser	Arg	Arg	Arg	Gly	Ala	Arg	Pro	Ala	Phe	Ala	Pro	Val	Asp	Leu	Gly	
	145					150					155					160	
5	Arg	Gly	Phe	Ala	Phe	Ala	Glu	Val	Glu	Leu	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Leu	
					165					170					175		
	Arg	Phe	Val	Ser	His	Pro	Asp	Gly	Thr	Asp	Val	Pro	Phe	Leu	Pro	Gly	
				180					185					190			
10	Phe	Glu	Gly	Val	Thr	Asn	Pro	Asp	Ala	Val	Asp	Tyr	Gly	Leu	Thr	Arg	
			195					200					205				
	Phe	Asp	His	Val	Val	Gly	Asn	Val	Pro	Glu	Leu	Ala	Pro	Ala	Ala	Ala	
		210					215					220					
15	Tyr	Ile	Ala	Gly	Phe	Thr	Gly	Phe	His	Glu	Phe	Ala	Glu	Phe	Thr	Ala	
	225					230					235					240	
	Glu	Asp	Val	Gly	Thr	Thr	Glu	Ser	Gly	Leu	Asn	Ser	Val	Val	Leu	Ala	
					245					250					255		
20	Asn	Asn	Ser	Glu	Gly	Val	Leu	Leu	Pro	Leu	Asn	Glu	Pro	Val	His	Gly	
				260					265					270			
	Thr	Lys	Arg	Arg	Ser	Gln	Ile	Gln	Thr	Phe	Leu	Glu	His	His	Gly	Gly	
25			275					280					285				
	Pro	Gly	Val	Gln	His	Ile	Ala	Val	Ala	Ser	Ser	Asp	Val	Leu	Arg	Thr	
		290					295					300					
30	Leu	Arg	Lys	Met	Arg	Ala	Arg	Ser	Ala	Met	Gly	Gly	Phe	Asp	Phe	Leu	
	305					310					315					320	
	Pro	Pro	Pro	Leu	Pro	Lys	Tyr	Tyr	Glu	Gly	Val	Arg	Arg	Leu	Ala	Gly	
					325					330					335		
35	Asp	Val	Leu	Ser	Glu	Ala	Gln	Ile	Lys	Glu	Cys	Gln	Glu	Leu	Gly	Val	
				340					345					350			
	Leu	Val	Asp	Arg	Asp	Asp	Gln	Gly	Val	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Thr	Lys	
40			355					360					365				
	Pro	Val	Gly	Asp	Arg	Pro	Thr	Leu	Phe	Leu	Glu	Met	Ile	Gln	Arg	Ile	
		370					375					380					
45	Gly	Cys	Met	Glu	Lys	Asp	Glu	Arg	Gly	Glu	Glu	Tyr	Gln	Lys	Gly	Gly	
	385					390					395					400	
	Cys	Gly	Gly	Phe	Gly	Lys	Gly	Asn	Phe	Ser	Glu	Leu	Phe	Lys	Ser	Ile	
					405					410					415		
50	Glu	Asp	Tyr	Glu	Lys	Ser	Leu	Glu	Ala	Lys	Gln	Ser	Ala	Ala	Val	Gln	
				420					425					430			
	Gly	Ser															
55																	
	<210>	68															
	<211>	442															
60	<212>	PRT															
	<213>	Daucus carota															

<400> 68

5	Met	Gly	Lys	Lys	Gln	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Leu	Ser	Ser	Asn	Ser	Ser	1	5	10	15
	Asn	Thr	Ser	Pro	Ala	Thr	Phe	Lys	Leu	Val	Gly	Phe	Asn	Asn	Phe	Val	20	25	30	
10	Arg	Ala	Asn	Pro	Lys	Ser	Asp	His	Phe	Ala	Val	Lys	Arg	Phe	His	His	35	40	45	
	Ile	Glu	Phe	Trp	Cys	Gly	Asp	Ala	Thr	Asn	Thr	Ser	Arg	Arg	Phe	Ser	50	55	60	
15	Trp	Gly	Leu	Gly	Met	Pro	Leu	Val	Ala	Lys	Ser	Asp	Leu	Ser	Thr	Gly	65	70	75	80
	Asn	Ser	Val	His	Ala	Ser	Tyr	Leu	Val	Arg	Ser	Ala	Asn	Leu	Ser	Phe	85	90	95	
20	Val	Phe	Thr	Ala	Pro	Tyr	Ser	Pro	Ser	Thr	Thr	Thr	Ser	Ser	Gly	Ser	100	105	110	
25	Ala	Ala	Ile	Pro	Ser	Phe	Ser	Ala	Ser	Gly	Phe	His	Ser	Phe	Ala	Ala	115	120	125	
	Lys	His	Gly	Leu	Ala	Val	Arg	Ala	Ile	Ala	Leu	Glu	Val	Ala	Asp	Val	130	135	140	
30	Ala	Ala	Ala	Phe	Glu	Ala	Ser	Val	Ala	Arg	Gly	Ala	Arg	Pro	Ala	Ser	145	150	155	160
	Ala	Pro	Val	Glu	Leu	Asp	Asp	Gln	Ala	Trp	Leu	Ala	Glu	Val	Glu	Leu	165	170	175	
35	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Leu	Arg	Phe	Val	Ser	Phe	Gly	Arg	Glu	Glu	Gly	180	185	190	
40	Leu	Phe	Leu	Pro	Gly	Phe	Glu	Ala	Val	Glu	Gly	Thr	Ala	Ser	Phe	Pro	195	200	205	
	Asp	Leu	Asp	Tyr	Gly	Ile	Arg	Arg	Leu	Asp	His	Ala	Val	Gly	Asn	Val	210	215	220	
45	Thr	Glu	Leu	Gly	Pro	Val	Val	Glu	Tyr	Ile	Lys	Gly	Phe	Thr	Gly	Phe	225	230	235	240
	His	Glu	Phe	Ala	Glu	Phe	Thr	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Thr	Leu	Glu	Ser	245	250	255	
50	Gly	Leu	Asn	Ser	Val	Val	Leu	Ala	Asn	Asn	Glu	Glu	Met	Val	Leu	Leu	260	265	270	
55	Pro	Leu	Asn	Glu	Pro	Val	Tyr	Gly	Thr	Lys	Arg	Lys	Ser	Gln	Ile	Gln	275	280	285	
	Thr	Tyr	Leu	Glu	His	Asn	Glu	Gly	Ala	Gly	Val	Gln	His	Leu	Ala	Leu	290	295	300	
60																				

	Val	Ser	Glu	Asp	Ile	Phe	Arg	Thr	Leu	Arg	Glu	Met	Arg	Lys	Arg	Ser	305	310	315	320
5	Cys	Leu	Gly	Gly	Phe	Glu	Phe	Met	Pro	Ser	Pro	Pro	Pro	Thr	Tyr	Tyr	325	330	335	
	Lys	Asn	Leu	Lys	Asn	Arg	Val	Gly	Asp	Val	Leu	Ser	Asp	Glu	Gln	Ile	340	345	350	
10	Lys	Glu	Cys	Glu	Asp	Leu	Gly	Ile	Leu	Val	Asp	Arg	Asp	Asp	Gln	Gly	355	360	365	
	Thr	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Thr	Lys	Pro	Val	Gly	Asp	Arg	Pro	Thr	Leu	370	375	380	
15	Phe	Ile	Glu	Ile	Ile	Gln	Arg	Val	Gly	Cys	Met	Leu	Lys	Asp	Asp	Ala	385	390	395	400
	Gly	Gln	Met	Tyr	Gln	Lys	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Phe	Gly	Lys	Gly	Asn	405	410	415	
20	Phe	Ser	Glu	Leu	Phe	Lys	Ser	Ile	Glu	Glu	Tyr	Glu	Lys	Thr	Leu	Glu	420	425	430	
25	Ala	Lys	Gln	Ile	Thr	Gly	Ser	Ala	Ala	Ala							435	440		
30	<210>	69																		
	<211>	380																		
	<212>	PRT																		
	<213>	Streptomyces	avermililis																	
35	<400>	69																		
	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	His	His	Thr	Pro	Asp	Thr	Ala	Arg	Gln	Ala	Asp	1	5	10	15
40	Pro	Phe	Pro	Val	Lys	Gly	Met	Asp	Ala	Val	Val	Phe	Ala	Val	Gly	Asn	20	25	30	
	Ala	Lys	Gln	Ala	Ala	His	Tyr	Ser	Thr	Ala	Phe	Gly	Met	Gln	Leu	Val	35	40	45	
45	Ala	Tyr	Ser	Gly	Pro	Glu	Asn	Gly	Ser	Arg	Glu	Thr	Ala	Ser	Tyr	Val	50	55	60	
	Leu	Thr	Asn	Gly	Ser	Ala	Arg	Phe	Val	Leu	Thr	Ser	Val	Ile	Lys	Pro	65	70	75	80
50	Ala	Thr	Pro	Trp	Gly	His	Phe	Leu	Ala	Asp	His	Val	Ala	Glu	His	Gly	85	90	95	
	Asp	Gly	Val	Val	Asp	Leu	Ala	Ile	Glu	Val	Pro	Asp	Ala	Arg	Ala	Ala	100	105	110	
55	His	Ala	Tyr	Ala	Ile	Glu	His	Gly	Ala	Arg	Ser	Val	Ala	Glu	Pro	Tyr	115	120	125	
60	Glu	Leu	Lys	Asp	Glu	His	Gly	Thr	Val	Val	Leu	Ala	Ala	Ile	Ala	Thr	130	135	140	

	Tyr	Gly	Lys	Thr	Arg	His	Thr	Leu	Val	Asp	Arg	Thr	Gly	Tyr	Asp	Gly	
	145					150					155					160	
5	Pro	Tyr	Leu	Pro	Gly	Tyr	Val	Ala	Ala	Ala	Pro	Ile	Val	Glu	Pro	Pro	
					165					170					175		
	Ala	His	Arg	Thr	Phe	Gln	Ala	Ile	Asp	His	Cys	Val	Gly	Asn	Val	Glu	
				180					185					190			
10	Leu	Gly	Arg	Met	Asn	Glu	Trp	Val	Gly	Phe	Tyr	Asn	Lys	Val	Met	Gly	
			195					200					205				
	Phe	Thr	Asn	Met	Lys	Glu	Phe	Val	Gly	Asp	Asp	Ile	Ala	Thr	Glu	Tyr	
15		210					215					220					
	Ser	Ala	Leu	Met	Ser	Lys	Val	Val	Ala	Asp	Gly	Thr	Leu	Lys	Val	Lys	
	225					230					235					240	
	Phe	Pro	Ile	Asn	Glu	Pro	Ala	Leu	Ala	Lys	Lys	Lys	Ser	Gln	Ile	Asp	
20					245					250					255		
	Glu	Tyr	Leu	Glu	Phe	Tyr	Gly	Gly	Ala	Gly	Val	Gln	His	Ile	Ala	Leu	
				260					265					270			
	Asn	Thr	Gly	Asp	Ile	Val	Glu	Thr	Val	Arg	Thr	Met	Arg	Ala	Ala	Gly	
25			275					280					285				
	Val	Gln	Phe	Leu	Asp	Thr	Pro	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Asp	Thr	Leu	Gly	Glu	
		290					295					300					
30	Trp	Val	Gly	Asp	Thr	Arg	Val	Pro	Val	Asp	Thr	Leu	Arg	Glu	Leu	Lys	
	305					310					315					320	
	Ile	Leu	Ala	Asp	Arg	Asp	Glu	Asp	Gly	Tyr	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Thr	
					325					330					335		
35	Lys	Pro	Val	Gln	Asp	Arg	Pro	Thr	Val	Phe	Phe	Glu	Ile	Ile	Glu	Arg	
				340					345					350			
	His	Gly	Ser	Met	Gly	Phe	Gly	Lys	Gly	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Phe	Glu	
40			355					360					365				
	Ala	Ile	Glu	Arg	Glu	Gln	Glu	Lys	Arg	Gly	Asn	Leu					
		370					375					380					
45																	
	<210> 70																
	<211> 419																
	<212> PRT																
	<213> Mycosphaerella graminicola																
50																	
	<400> 70																
	Met	Ala	Pro	Gly	Ala	Leu	Leu	Val	Thr	Ser	Gln	Asn	Gly	Arg	Thr	Ser	
	1				5					10					15		
55	Pro	Leu	Tyr	Asp	Ser	Asp	Gly	Tyr	Val	Pro	Ala	Pro	Ala	Ala	Leu	Val	
				20					25					30			
	Val	Gly	Gly	Glu	Val	Asn	Tyr	Arg	Gly	Tyr	His	His	Ala	Glu	Trp	Trp	
60			35					40					45				

	Val	Gly	Asn	Ala	Lys	Gln	Val	Ala	Gln	Phe	Tyr	Ile	Thr	Arg	Met	Gly	
	50						55					60					
5	Phe	Glu	Pro	Val	Ala	His	Lys	Gly	Leu	Glu	Thr	Gly	Ser	Arg	Phe	Phe	
	65					70					75					80	
	Ala	Ser	His	Val	Val	Gln	Asn	Asn	Gly	Val	Arg	Phe	Val	Phe	Thr	Ser	
					85					90					95		
10	Pro	Val	Arg	Ser	Ser	Ala	Arg	Gln	Thr	Leu	Lys	Ala	Ala	Pro	Leu	Ala	
				100					105					110			
	Asp	Gln	Ala	Arg	Leu	Asp	Glu	Met	Tyr	Asp	His	Leu	Asp	Lys	His	Gly	
			115					120					125				
15	Asp	Gly	Val	Lys	Asp	Val	Ala	Phe	Glu	Val	Asp	Asp	Val	Leu	Ala	Val	
		130					135					140					
	Tyr	Glu	Asn	Ala	Val	Ala	Asn	Gly	Ala	Glu	Ser	Val	Ser	Ser	Pro	His	
	145					150					155					160	
20	Thr	Asp	Ser	Cys	Asp	Glu	Gly	Asp	Val	Ile	Ser	Ala	Ala	Ile	Lys	Thr	
					165					170					175		
	Tyr	Gly	Asp	Thr	Thr	His	Thr	Phe	Ile	Gln	Arg	Thr	Thr	Tyr	Thr	Gly	
25				180					185					190			
	Pro	Phe	Leu	Pro	Gly	Tyr	Arg	Ser	Cys	Thr	Thr	Val	Asp	Ser	Ala	Asn	
			195					200					205				
30	Lys	Phe	Leu	Pro	Pro	Val	Asn	Leu	Glu	Ala	Ile	Asp	His	Cys	Val	Gly	
		210					215					220					
	Asn	Gln	Asp	Trp	Asp	Glu	Met	Ser	Asp	Ala	Cys	Asp	Phe	Tyr	Glu	Arg	
	225					230					235					240	
35	Cys	Leu	Gly	Phe	His	Arg	Phe	Trp	Ser	Val	Asp	Asp	Lys	Asp	Ile	Cys	
					245					250					255		
	Thr	Glu	Phe	Ser	Ala	Leu	Lys	Ser	Ile	Val	Met	Ser	Ser	Pro	Asn	Gln	
				260					265					270			
40	Val	Val	Lys	Met	Pro	Ile	Asn	Glu	Pro	Ala	His	Gly	Lys	Lys	Lys	Ser	
			275					280					285				
	Gln	Ile	Glu	Glu	Tyr	Val	Asp	Phe	Tyr	Asn	Gly	Pro	Gly	Val	Gln	His	
45		290					295					300					
	Ile	Ala	Leu	Arg	Thr	Pro	Asn	Ile	Ile	Glu	Ala	Val	Ser	Asn	Leu	Arg	
	305					310					315					320	
50	Ser	Arg	Gly	Val	Glu	Phe	Ile	Ser	Val	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Glu	Asn	
					325					330					335		
	Met	Arg	Leu	Arg	Leu	Lys	Ala	Ala	Gly	Met	Lys	Leu	Glu	Glu	Ser	Phe	
				340					345					350			
55	Asp	Ile	Ile	Gln	Lys	Leu	Asn	Ile	Leu	Ile	Asp	Phe	Asp	Glu	Gly	Gly	
			355					360					365				
	Tyr	Leu	Leu	Gln	Leu	Phe	Thr	Lys	Pro	Leu	Met	Asp	Arg	Pro	Thr	Val	
60		370					375					380					

Phe Ile Glu Ile Ile Gln Arg Asn Asn Phe Asp Gly Phe Gly Ala Gly
 385 390 395 400
 Asn Phe Lys Ser Leu Phe Glu Ala Ile Glu Arg Glu Gln Asp Leu Arg
 5 405 410 415
 Gly Asn Leu
 10
 <210> 71
 <211> 399
 <212> PRT
 <213> Coccicoides immitis
 15
 <400> 71
 Met Ala Pro Ala Ala Asp Ser Pro Thr Leu Gln Pro Ala Gln Pro Ser
 1 5 10 15
 20
 Asp Leu Asn Gln Tyr Arg Gly Tyr Asp His Val His Trp Tyr Val Gly
 20 25 30
 Asn Ala Lys Gln Ala Ala Thr Tyr Tyr Val Thr Arg Met Gly Phe Glu
 35 40 45
 25
 Arg Val Ala Tyr Arg Gly Leu Glu Thr Gly Ser Lys Ala Val Ala Ser
 50 55 60
 30
 His Val Val Arg Asn Gly Asn Ile Thr Phe Ile Leu Thr Ser Pro Leu
 65 70 75 80
 Arg Ser Val Glu Gln Ala Ser Arg Phe Pro Glu Asp Glu Ala Leu Leu
 85 90 95
 35
 Lys Glu Ile His Ala His Leu Glu Arg His Gly Asp Gly Val Lys Asp
 100 105 110
 Val Ala Phe Glu Val Asp Cys Val Glu Ser Val Phe Ser Ala Ala Val
 115 120 125
 40
 Arg Asn Gly Ala Glu Val Val Ser Asp Val Arg Thr Val Glu Asp Glu
 130 135 140
 Asp Gly Gln Ile Lys Met Ala Thr Ile Arg Thr Tyr Gly Glu Thr Thr
 145 150 155 160
 45
 His Thr Leu Ile Glu Arg Ser Gly Tyr Arg Gly Gly Phe Met Pro Gly
 165 170 175
 Tyr Arg Met Glu Ser Asn Ala Asp Ala Thr Ser Lys Phe Leu Pro Lys
 180 185 190
 50
 Val Val Leu Glu Arg Ile Asp His Cys Val Gly Asn Gln Asp Trp Asp
 195 200 205
 55
 Glu Met Glu Arg Val Cys Asp Tyr Tyr Glu Lys Ile Leu Gly Phe His
 210 215 220
 Arg Phe Trp Ser Val Asp Asp Lys Asp Ile Cys Thr Glu Phe Ser Ala
 225 230 235 240
 60

	Leu	Lys	Ser	Ile	Val	Met	Ala	Ser	Pro	Asn	Asp	Ile	Val	Lys	Met	Pro	
					245					250					255		
5	Ile	Asn	Glu	Pro	Ala	Lys	Gly	Lys	Lys	Gln	Ser	Gln	Ile	Glu	Glu	Tyr	
				260						265				270			
	Val	Asp	Phe	Tyr	Asn	Gly	Ala	Gly	Val	Gln	His	Ile	Ala	Leu	Arg	Thr	
			275					280					285				
10	Asn	Asn	Ile	Ile	Asp	Ala	Ile	Thr	Asn	Leu	Lys	Ala	Arg	Gly	Thr	Glu	
		290					295					300					
	Phe	Ile	Lys	Val	Pro	Glu	Thr	Tyr	Tyr	Glu	Asp	Met	Lys	Ile	Arg	Leu	
	305				310					315							320
15	Lys	Arg	Gln	Gly	Leu	Val	Leu	Asp	Glu	Asp	Phe	Glu	Thr	Leu	Lys	Ser	
				325						330							335
	Leu	Asp	Ile	Leu	Ile	Asp	Phe	Asp	Glu	Asn	Gly	Tyr	Leu	Leu	Gln	Leu	
20				340					345					350			
	Phe	Thr	Lys	His	Leu	Met	Asp	Arg	Pro	Thr	Val	Phe	Ile	Glu	Ile	Ile	
			355					360					365				
25	Gln	Arg	Asn	Asn	Phe	Ser	Gly	Phe	Gly	Ala	Gly	Asn	Phe	Arg	Ala	Leu	
		370					375					380					
	Phe	Glu	Ala	Ile	Glu	Arg	Glu	Gln	Ala	Leu	Arg	Gly	Thr	Leu	Ile		
30	385				390					395							
	<210>	72															
	<211>	350															
35	<212>	PRT															
	<213>	Synechococcoideae spp.															
	<400>	72															
40	Met	Asn	Pro	Ser	Ile	Arg	Ile	Val	Gln	Gly	Ile	His	His	Leu	His	Phe	
	1				5					10				15			
	Tyr	Leu	Trp	Asp	Leu	Pro	Arg	Trp	Arg	Glu	His	Phe	Cys	Arg	Val	Trp	
				20					25				30				
45	Gly	Phe	Arg	Val	Ala	Ser	Asp	Ala	Gly	Asn	Thr	Leu	Glu	Leu	Glu	Gln	
			35				40					45					
	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Arg	Leu	Ser	Gln	Pro	Ala	Arg	Ala	Gly	Asp	Glu	
50		50			55				60								
	Val	Asp	Arg	His	Leu	Gln	Arg	His	Gly	Pro	Gly	Val	Val	Asp	Val	Ala	
	65				70				75							80	
55	Leu	Ala	Val	Gly	Glu	Gln	Glu	Leu	Pro	Ala	Leu	Ala	Glu	Leu	Leu	Arg	
				85				90								95	
	Gly	Arg	Gly	Ala	Gln	Leu	Ala	Trp	Ile	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	Cys	
				100				105							110		
60																	

	Leu	His	Thr	Pro	Tyr	Gly	Ile	Arg	His	Ser	Leu	Ile	Pro	Gly	Pro	Leu	
			115					120					125				
5	Asp	Ala	Ala	Pro	Ala	Glu	Ala	Gly	Leu	Phe	Ser	His	Trp	Asp	His	Val	
		130					135					140					
	Val	Leu	Asn	Val	Glu	Gln	Gly	Ser	Leu	Gln	Ala	Ala	Ala	Asp	Trp	Tyr	
	145					150					155					160	
10	Gly	Arg	Val	Leu	Gly	Trp	Arg	Arg	Leu	Tyr	Arg	Tyr	Ser	Ile	Gly	Thr	
					165					170					175		
	Ala	Thr	Ser	Gly	Leu	Glu	Ser	Val	Val	Val	Gly	Asp	Pro	Glu	Ala	Gly	
				180					185					190			
15	Ile	Gln	Trp	Ala	Ile	Asn	Glu	Pro	Thr	Cys	Ala	Ala	Ser	Gln	Ile	Gln	
			195					200					205				
	Glu	Phe	Leu	His	Ala	His	Gly	Gly	Pro	Gly	Ile	Gln	His	Ala	Ala	Leu	
20		210					215					220					
	His	Ser	Ser	Asp	Ile	Val	Ala	Ser	Leu	Arg	Arg	Leu	Arg	Gln	Gly	Gly	
	225					230				235						240	
25	Val	Asp	Phe	Leu	Gln	Val	Ala	Pro	Gln	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Leu	Glu	Arg	
					245					250					255		
	Glu	Leu	Gly	Leu	Ala	Leu	Arg	Ser	Ala	Leu	Gly	Gln	Ala	Ile	Ser	Trp	
				260					265					270			
30	Gln	Asp	Leu	Val	Glu	Gln	Gln	Ile	Leu	Leu	Asp	Ala	Thr	Leu	Pro	Ala	
			275					280					285				
	Ser	Asp	Gly	Gln	Asp	Arg	Pro	Leu	Leu	Leu	Gln	Thr	Phe	Thr	Gln	Pro	
		290					295					300					
35	Leu	Phe	Gly	Arg	Pro	Thr	Phe	Phe	Phe	Glu	Val	Ile	Gln	Arg	Leu	Gly	
	305					310					315					320	
	Gly	Ala	Thr	Gly	Phe	Gly	Glu	Ala	Asn	Phe	Gln	Ala	Leu	Phe	Glu	Ala	
40					325					330					335		
	Leu	Glu	Arg	Gln	Gln	Arg	Gln	Arg	His	Gln	Ala	Leu	Thr	Pro			
				340					345					350			
45																	
	<210> 73																
	<211> 368																
	<212> PRT																
	<213> Picrophilus torridus																
50																	
	<400> 73																
	Met	Tyr	Gly	Lys	Asn	Leu	Ile	Ser	Glu	Leu	Arg	Glu	Lys	Glu	Ile	Phe	
	1				5					10					15		
55	Lys	Arg	Leu	His	His	Val	Glu	Phe	Tyr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Trp	
				20					25					30			
	Ser	Tyr	Phe	Met	Asn	Arg	Gly	Leu	Gly	Phe	Lys	Thr	Val	Ala	Tyr	Ala	
60			35					40					45				

	Gly	Pro	Glu	Thr	Gly	Ile	Arg	Asp	Lys	Ile	Ser	Tyr	Val	Met	Ser	Gln	
	50					55					60						
5	Gly	Thr	Ala	Arg	Ile	Ser	Phe	Thr	Ser	Ser	Met	Asn	Asp	Asp	Ser	Tyr	
	65					70					75					80	
	Ile	Ser	Asn	His	Val	Lys	Lys	His	Gly	Asp	Gly	Val	Lys	Asp	Ile	Ala	
					85					90					95		
10	Leu	Glu	Val	Asp	Asp	Leu	Asp	Glu	Ala	Lys	Ser	Leu	Ile	Glu	Lys	Tyr	
				100					105					110			
	Gly	Thr	Lys	Val	Ser	Lys	Ile	Asn	Glu	Ile	Lys	Asp	Gly	Asn	Gly	Lys	
			115					120					125				
15	Ile	Arg	Thr	Ala	Glu	Ile	Lys	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Val	His	Thr	Leu	
	130					135							140				
	Ile	Glu	Thr	Gly	Asp	Tyr	Asn	Gly	Val	Phe	Met	Pro	Gly	Tyr	Glu	Glu	
20	145				150					155						160	
	Ser	Glu	Ile	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Gly	Ile	Lys	Lys	Ile	Asp	His	Ile	
				165					170						175		
25	Val	Gly	Asn	Val	Tyr	Glu	Gly	Glu	Met	Asp	Ser	Trp	Val	Asn	Phe	Tyr	
				180					185					190			
	Ile	Glu	Lys	Leu	Gly	Phe	Glu	His	Leu	Ile	Thr	Phe	Asp	Asp	Lys	Asp	
			195					200					205				
30	Ile	Arg	Thr	Asp	Tyr	Ser	Ala	Leu	Arg	Ser	Lys	Val	Val	Lys	Tyr	Asn	
	210					215						220					
	Asp	Asp	Ile	Val	Phe	Pro	Ile	Asn	Glu	Pro	Ala	Lys	Gly	Leu	Arg	Lys	
	225				230					235						240	
35	Ser	Gln	Ile	Glu	Glu	Tyr	Leu	Asp	Tyr	Tyr	Arg	Ser	Glu	Gly	Val	Gln	
				245					250						255		
	His	Ile	Ala	Leu	Leu	Thr	Asp	Asp	Ile	Ile	Lys	Thr	Val	Ser	Met	Met	
40				260					265					270			
	Glu	Glu	Asn	Gly	Ile	Glu	Phe	Leu	Lys	Thr	Pro	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Glu	
			275					280					285				
45	Ser	Leu	Ser	Ser	Arg	Ile	Gly	Ser	Ile	Asp	Glu	Asp	Leu	Asn	Glu	Ile	
	290				295					300							
	Glu	Lys	His	Asn	Ile	Leu	Val	Asp	Arg	Asp	Glu	Asn	Gly	Tyr	Leu	Leu	
	305				310					315						320	
50	Gln	Ile	Phe	Thr	Lys	Pro	Val	Thr	Asp	Arg	Pro	Thr	Phe	Phe	Phe	Glu	
				325					330					335			
	Val	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Ala	Arg	Ser	Phe	Gly	Asn	Gly	Asn	Phe	Lys	
55				340					345					350			
	Ala	Leu	Phe	Glu	Ala	Ile	Glu	Arg	Glu	Gln	Ala	Lys	Arg	Gly	Asn	Leu	
			355					360					365				
60	<210>	74															

<211> 387
 <212> PRT
 <213> Kordia algicida

5 <400> 74

	Met	Ala	Ala	Glu	Ile	Lys	Asn	Leu	Lys	Asp	Leu	Gln	Asn	Thr	Glu	Tyr	
	1				5					10					15		
10	Gly	Leu	Lys	Lys	Leu	Phe	Asp	Glu	Ala	Glu	Asp	Phe	Leu	Pro	Leu	Leu	
				20					25					30			
	Gly	Thr	Asp	Tyr	Val	Glu	Leu	Tyr	Val	Gly	Asn	Ala	Lys	Gln	Ser	Ala	
			35					40					45				
15	His	Phe	Tyr	Lys	Thr	Ala	Phe	Gly	Phe	Gln	Ser	Glu	Ala	Tyr	Ala	Gly	
		50					55					60					
	Leu	Glu	Thr	Gly	Leu	Thr	Asp	Arg	Val	Ser	Tyr	Val	Leu	Lys	Gln	Asp	
20	65					70				75						80	
	Lys	Ile	Arg	Leu	Val	Leu	Thr	Thr	Pro	Leu	Gly	Lys	Gly	Gly	Glu	Ile	
				85						90					95		
25	Asn	Glu	His	Ile	Asp	Leu	His	Gly	Asp	Gly	Val	Lys	Val	Val	Ala	Leu	
				100					105					110			
	Trp	Val	Glu	Asp	Ala	Thr	Lys	Ala	Phe	Glu	Glu	Thr	Thr	Lys	Arg	Gly	
			115					120					125				
30	Ala	Lys	Pro	Tyr	Met	Glu	Pro	Thr	Lys	Glu	Glu	Asp	Glu	Asn	Gly	Tyr	
		130					135					140					
	Val	Ile	Arg	Ser	Gly	Ile	Tyr	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Val	His	Val	Phe	
	145					150				155						160	
35	Val	Glu	Arg	Lys	Asn	Tyr	Asn	Gly	Val	Phe	Leu	Pro	Gly	Tyr	Gln	Arg	
					165					170					175		
	Trp	Glu	Ser	His	Tyr	Asn	Pro	Glu	Pro	Val	Gly	Leu	Lys	Phe	Ile	Asp	
40				180					185					190			
	His	Met	Val	Gly	Asn	Val	Gly	Trp	Gly	Glu	Met	Lys	Glu	Trp	Cys	Glu	
			195					200					205				
45	Phe	Tyr	Ala	Lys	Val	Met	Gly	Phe	Ala	Gln	Ile	Ile	Ser	Phe	Thr	Asp	
		210					215					220					
	Asp	Asp	Ile	Ser	Thr	Asp	Phe	Thr	Ala	Leu	Met	Ser	Lys	Val	Met	Ser	
	225					230					235					240	
50	Asn	Gly	Asn	Gly	Arg	Ile	Lys	Phe	Pro	Ile	Asn	Glu	Pro	Ala	Glu	Gly	
					245					250					255		
	Lys	Lys	Lys	Ser	Gln	Ile	Glu	Glu	Tyr	Leu	Asp	Phe	Tyr	Asn	Gly	Ser	
				260					265					270			
55	Gly	Val	Gln	His	Ile	Ala	Val	Ala	Thr	Asp	Asn	Ile	Ile	Asp	Thr	Val	
			275					280					285				
	Ser	Gln	Met	Arg	Glu	Arg	Gly	Val	Glu	Phe	Leu	Tyr	Val	Pro	Asp	Thr	
60		290					295					300					

Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Glu Arg Val Gly Asp Ile Asp Glu Asp Val
 305 310 315 320
 5 Glu Glu Leu Lys Lys His Gly Ile Leu Ile Asp Arg Asp Glu Glu Gly
 325 330 335
 Tyr Leu Leu Gln Leu Phe Thr Lys Thr Ile Val Asp Arg Pro Thr Met
 340 345 350
 10 Phe Phe Glu Val Ile Gln Arg Lys Gly Ala Gln Ser Phe Gly Val Gly
 355 360 365
 Asn Phe Lys Ala Leu Phe Glu Ala Ile Glu Arg Glu Gln Ala Ala Arg
 370 375 380
 15 Gly Thr Leu
 385
 20 <210> 75
 <211> 382
 <212> PRT
 <213> Blepharisma japonicum
 25 <400> 75
 Met Thr Tyr Tyr Asp Lys Gln Glu Thr Arg Pro Asp Leu Gly Glu Phe
 1 5 10 15
 30 Tyr Gly Phe His His Val Arg Phe Tyr Val Ser Asn Ser Glu Gln Ala
 20 25 30
 Ala Ser Phe Tyr Thr Ser Arg Phe Gly Phe Ser Pro Val Ala Tyr Glu
 35 35 40 45
 Gly Leu Glu Thr Gly Asn Gln Lys Phe Cys Thr Asn Val Val Arg Ser
 50 55 60
 Asn His Val Val Ile Ala Phe Thr Ser Ala Leu Thr Pro Glu Asp Asn
 65 70 75 80
 40 Glu Val Asn Arg His Val Gly Lys His Ser Asp Gly Val Gln Asp Ile
 85 90 95
 Ala Phe Ser Val Ser Asp Ala Arg Gly Met Tyr Glu Lys Ala Ile Ala
 45 100 105 110
 Lys Gly Cys Lys Ser Phe Arg Glu Pro Gln Val Leu Gln Asp Gln Phe
 115 120 125
 50 Gly Ser Val Ile Ile Ala Ser Leu Gln Thr Tyr Gly Asp Thr Val His
 130 135 140
 Thr Leu Val Gln Asn Val Asp Tyr Thr Gly Pro Phe Leu Pro Gly Phe
 145 150 155 160
 55 Arg Ala Ile Thr Lys Asp Asp Pro Leu Asn Ser Ala Phe Pro Gln Val
 165 170 175
 60 Asn Tyr Asp Ile Ile Asp His Val Val Gly Asn Gln Pro Gly Gly Asp
 180 185 190

	Met	Thr	Pro	Thr	Val	Glu	Trp	Tyr	Glu	Lys	Tyr	Leu	Glu	Phe	His	Arg
			195					200					205			
5	Tyr	Trp	Ser	Ala	Asp	Glu	Ser	Val	Ile	His	Thr	Asp	Tyr	Ser	Ala	Leu
		210					215					220				
	Arg	Ser	Val	Val	Val	Ala	Asp	Trp	Asp	Glu	Val	Ile	Lys	Met	Pro	Ile
	225					230					235					240
10	Asn	Glu	Pro	Ala	Asp	Gly	Leu	Arg	Lys	Ser	Gln	Ile	Gln	Glu	Tyr	Val
					245					250					255	
	Glu	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ala	Gly	Val	Gln	His	Ile	Ala	Leu	Lys	Val	Asn
15				260					265					270		
	Asp	Ile	Ile	Ser	Val	Ile	Ser	Thr	Leu	Arg	Ala	Arg	Gly	Val	Glu	Phe
			275					280					285			
20	Leu	Glu	Val	Pro	Pro	Lys	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Leu	Arg	Lys	Arg	Leu	Ala
		290					295					300				
	His	Ser	Ala	Val	Gln	Ile	Glu	Glu	Asp	Leu	Lys	Arg	Ile	Glu	Asp	Leu
	305					310					315					320
25	His	Ile	Leu	Val	Asp	Phe	Asp	Asp	Arg	Gly	Tyr	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe
					325					330					335	
	Thr	Lys	Pro	Val	Glu	Asp	Arg	Pro	Thr	Leu	Phe	Tyr	Glu	Ile	Ile	Gln
30				340					345					350		
	Arg	His	Asn	Asn	Asn	Gly	Phe	Gly	Ile	Gly	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Phe
			355					360					365			
35	Glu	Ser	Leu	Glu	Gln	Glu	Gln	Glu	Arg	Arg	Gly	Asn	Leu	Ile		
		370					375					380				
	<210>	76														
40	<211>	401														
	<212>	PRT														
	<213>	Rhodococcus	sp.													
	<400>	76														
45	Met	Thr	Ile	Glu	Gln	Thr	Leu	Thr	Asp	Lys	Glu	Arg	Leu	Ala	Gly	Leu
	1				5					10					15	
	Asp	Leu	Gly	Gln	Leu	Glu	Gln	Leu	Val	Gly	Leu	Val	Glu	Tyr	Asp	Gly
50				20					25					30		
	Thr	Arg	Asp	Pro	Phe	Pro	Val	Ser	Gly	Trp	Asp	Ala	Val	Val	Trp	Val
			35					40					45			
55	Val	Gly	Asn	Ala	Thr	Gln	Thr	Ala	His	Tyr	Phe	Gln	Ser	Ala	Phe	Gly
		50					55					60				
	Met	Thr	Leu	Val	Ala	Tyr	Ser	Gly	Pro	Thr	Thr	Gly	Asn	Arg	Asp	His
	65					70					75					80
60	His	Ser	Phe	Val	Leu	Glu	Ser	Gly	Ala	Val	Arg	Phe	Val	Ile	Lys	Gly
					85					90					95	

	Ala	Val	Asn	Pro	Asp	Ser	Pro	Leu	Ile	Asp	His	His	Arg	Thr	His	Gly	
				100					105					110			
5	Asp	Gly	Val	Val	Asp	Ile	Ala	Leu	Ala	Val	Pro	Asp	Val	Asp	Lys	Cys	
			115					120					125				
	Ile	Ala	His	Ala	Arg	Ala	Gln	Gly	Ala	Thr	Val	Leu	Asp	Glu	Pro	His	
		130					135					140					
10	Asp	Val	Thr	Asp	Asp	His	Gly	Thr	Val	Arg	Leu	Ala	Ala	Ile	Ala	Thr	
	145					150					155					160	
	Tyr	Gly	Asp	Thr	Arg	His	Thr	Leu	Val	Asp	Arg	Ser	His	Tyr	Thr	Gly	
15					165					170					175		
	Pro	Tyr	Leu	Pro	Gly	Tyr	Thr	Ala	Arg	Thr	Ser	Gly	His	Thr	Lys	Arg	
				180					185					190			
20	Asp	Gly	Ala	Pro	Lys	Arg	Leu	Phe	Gln	Ala	Leu	Asp	His	Val	Val	Gly	
			195					200					205				
	Asn	Val	Glu	Leu	Gly	Lys	Met	Asp	His	Trp	Val	Asp	Phe	Tyr	Asn	Arg	
25		210					215					220					
	Val	Met	Gly	Phe	Thr	Asn	Met	Ala	Glu	Phe	Val	Gly	Glu	Asp	Ile	Ala	
	225					230					235					240	
	Thr	Asp	Tyr	Ser	Ala	Leu	Met	Ser	Lys	Val	Val	Ser	Asn	Gly	Asn	His	
30					245					250					255		
	Arg	Val	Lys	Phe	Pro	Leu	Asn	Glu	Pro	Ala	Leu	Ala	Lys	Lys	Arg	Ser	
				260					265					270			
35	Gln	Ile	Asp	Glu	Tyr	Leu	Asp	Phe	Tyr	Arg	Gly	Pro	Gly	Ala	Gln	His	
			275					280					285				
	Leu	Ala	Leu	Ala	Thr	Asn	Asp	Ile	Leu	Thr	Ala	Val	Asp	Gln	Leu	Thr	
40		290					295					300					
	Ala	Glu	Gly	Val	Glu	Phe	Leu	Ala	Thr	Pro	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Glu	Asp	
	305					310					315					320	
	Pro	Glu	Leu	Arg	Ala	Arg	Ile	Gly	Asn	Val	Arg	Ala	Pro	Ile	Ala	Glu	
45					325					330					335		
	Leu	Gln	Lys	Arg	Gly	Ile	Leu	Val	Asp	Arg	Asp	Glu	Asp	Gly	Tyr	Leu	
				340					345					350			
50	Leu	Gln	Ile	Phe	Thr	Lys	Pro	Leu	Val	Asp	Arg	Pro	Thr	Val	Phe	Phe	
			355					360					365				
	Glu	Leu	Ile	Glu	Arg	His	Gly	Ser	Leu	Gly	Phe	Gly	Ile	Gly	Asn	Phe	
		370					375					380					
55	Lys	Ala	Leu	Phe	Glu	Ala	Ile	Glu	Arg	Glu	Gln	Ala	Ala	Arg	Gly	Asn	
	385					390					395					400	
	Phe																
60																	

<210> 77
 <211> 18
 <212> DNA
 5 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> histidine tag

10 <400> 77
 catcaccatc accatcac
 5

18

15

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Рекombінантна молекула нуклеїнової кислоти, яка кодує фермент 4-гідроксифенілпіруват деоксигеназу (HPPD), де вказана молекула нуклеїнової кислоти кодує амінокислотну послідовність, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності до SEQ ID NO:1 і амінокислотні заміщення:
 - заміщення глутаміну проліном в амінокислотному положенні, що відповідає положенню амінокислоти 335 в послідовності SEQ ID NO:1, заміщення гліцину триптофаном в амінокислотному положенні, що відповідає положенню амінокислоти 336 в послідовності SEQ ID NO:1, заміщення лізину аланіном в амінокислотному положенні, що відповідає положенню амінокислоти 339 в послідовності SEQ ID NO:1, і заміщення аланіну глутаміном в амінокислотному положенні, що відповідає положенню амінокислоти 340 в послідовності SEQ ID NO:1;
 - де вказаний HPPD фермент є толерантним до гербіциду - HPPD інгібітора.
2. Рекombінантна молекула нуклеїнової кислоти за п. 1, де вказана нуклеотидна послідовність кодує амінокислотну послідовність, що має щонайменше 90 % ідентичності послідовності до амінокислотної послідовності, представленої в послідовності SEQ ID NO:16.
3. Рекombінантна молекула нуклеїнової кислоти за п. 1 або 2, де:
 - a) вказана нуклеотидна послідовність була оптимізована для експресії в рослині; та/або
 - b) вказана нуклеотидна послідовність функціонально зв'язана з промотором, здатним спрямовувати експресію нуклеотидної послідовності в рослинній клітині.
4. Конструкція, що містить молекулу нуклеїнової кислоти за будь-яким з пп. 1-3, краще додатково містить молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує гетерологічний поліпептид.
5. Клітина-хазяїн, що містить рекombінантну молекулу нуклеїнової кислоти за будь-яким з пп. 1-3 і краще являє собою бактеріальну клітину-хазяїна або рослинну клітину-хазяїна.
6. Трансгенна рослина, що містить рекombінантну молекулу нуклеїнової кислоти за п. 1, де краще вказана рослина вибрана з групи, що складається з кукурудзи, сорго, пшениці, соняшнику, томатів, хрестоцвітих, перців, картоплі, бавовнику, рису, сої, цукрового буряку, цукрової тростини, тютюну, ячменю та олійного ріпаку.
7. Трансгенне насіння, що містить рекombінантну молекулу нуклеїнової кислоти за будь-яким з пп. 1-3.
8. Рекombінантний поліпептид, що містить HPPD фермент, де вказаний HPPD фермент є толерантним до гербіциду - HPPD інгібітора, і де вказаний поліпептид має щонайменше 90 % ідентичності послідовності до SEQ ID NO:1 і включає амінокислотні заміщення:
 - заміщення глутаміну проліном в амінокислотному положенні, що відповідає положенню амінокислоти 335 в послідовності SEQ ID NO:1, заміщення гліцину триптофаном в амінокислотному положенні, що відповідає положенню амінокислоти 336 в послідовності SEQ ID NO:1, заміщення лізину аланіном в амінокислотному положенні, що відповідає положенню амінокислоти 339 в послідовності SEQ ID NO:1, і заміщення аланіну глутаміном в амінокислотному положенні, що відповідає положенню амінокислоти 340 в послідовності SEQ ID NO:1.
9. Рекombінантний поліпептид за п. 8:
 - a) де вказана амінокислотна послідовність має щонайменше 90 % ідентичності послідовності до амінокислотної послідовності, представленої в послідовності SEQ ID NO:16;
 - b) де вказаний гербіцид - HPPD інгібітор вибраний із групи, яка складається з N-(тетразол-4-іл)- або N-(триазол-3-іл)арилкарбоксаміду, N-(1,2,5-оксадіазол-3-іл)бензаміду, темботріону,

с) рекомбінантний поліпептид додатково містить гетерологічну амінокислотну послідовність.

5

10

(а) рослинної клітини, рослинної тканини і насіння рослини; та/або

15

<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MADLYENPMGLMG-----FEF	16
<i>Avena sativa</i>	MPPTPAT-ATGAAAAAVTPEHAARS----FPRVVRVNPRSDRFVLSFHH	45
<i>Avena sativa</i>	MPPTPAT-ATGAAAAAVTPEHAARS----FPRVVRVNPRSDRFVLSFHH	45
<i>Zea mays</i>	MPPTTAAAGAAVAAAAAEEQAARFLVGHNRNFRFNPRSDRFHTLAFHH	50
<i>Streptomyces avermitilis</i>	MTQTTHTTPTDARQADFPF-----VKGMDA	25
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MGHQNAAVSENQNHDDGAASSPGFKLVG-FSKFVRKNPKSDKFKVKRFHH	49
<i>Hordeum vulgare</i>	MPPTTPTPATGAAAAVTEHARP-----HRMVFRNPRSDRFHTLSFHH	44
<i>Daucus carota</i>	MGKK-QSEAEILSSNSSTSPATFKLVG-FNNFVRANPKSDHFVAVKRFHH	48
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	MAPGALLVTSQNGRTSPLYDSGYVPAP-----AALVVGGEVNYRGYHH	44
<i>Coccidioides immitis</i>	MAPAADSPSTLOPAQPSDLN-----OYRGYDH	26

<i>Pseudomonas fluorescens</i>	IEFASPTPGTLEPIFEIMGFTKVATHRSKN-----VHLYRQGEINLIL	59
<i>Avena sativa</i>	VELWCADAASAAGRFSFALGAPLAARSDLSTGNSAHASLLLRSGALAFLF	95
<i>Avena sativa</i>	VELWCADAASAAGRFSFALGAPLAARSDLSTGNSAHASLLLRSGALAFLF	95
<i>Zea mays</i>	VELWCADAASAAGRFSFALGAPLAARSDLSTGNSAHASLLLRSGLSLFL	100
<i>Streptomyces avermitilis</i>	VVFAVGNAKQAA-HYSTAFGMQLVAYSPENGSRETASYVLTVNGSARFVL	74
<i>Arabidopsis thaliana</i>	IEFWCGDATNVARRFSWGLGMRFSAKSDLTSGNMVHASYLLTSGDLRFLF	99
<i>Hordeum vulgare</i>	VEFWCADAASAAGRFAFALGAPLAARSDLSTGNSAHASQLLRSGSLAFLF	94
<i>Daucus carota</i>	IEFWCGDATNTSRFSWGLGMPLVAKSDLTGSNVHASYLVQRANLSFVF	98
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	AENWVGNAKQVAQFYITRMGFEPAVHKGLETGSRFFASHVVQNVGRFVF	94
<i>Coccidioides immitis</i>	VHWYVGNAKQAATYYVTRMGFERVAYRGLETGSKAVASHVVRNGNITFIL	76

<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NNEPNS-----IASYFAAEHGSPVCGMAFRVKDS	88
<i>Avena sativa</i>	TAPYAPPPQEA-AT-AATASIPFSADAARTFAAAHGLAVRSVGVVRADA	143
<i>Avena sativa</i>	TAPYAPPPQEA-ATAAATASIPFSADAARTFAAAHGLAVRSVGVVRADA	144
<i>Zea mays</i>	TAPYAH-----GADAATAALPSFSAARRFAADHGLAVRAVALRVADA	144
<i>Streptomyces avermitilis</i>	TSVIKATPWG-----HFLA-----DHVAEHDGVDVLAEVPPDA	109
<i>Arabidopsis thaliana</i>	TAPYSPSLSGAEIKPTTTASIPSFHDGSCRSFFSSHGLGVRAVAIEVEDA	149
<i>Hordeum vulgare</i>	TAPYAN-----GCDAATASLPFSADAARRFSADHGIAVRSVALRVADA	138
<i>Daucus carota</i>	TAPYSPSTQT-----SSGSAATPSFSAAGFHSFAAKHGLAVRAIALEVADV	144
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	TSFVRSRRAT---LKAAPLADQARLDKHDGDKGVKDAFVAFVDDV	141
<i>Coccidioides immitis</i>	TSPLRSVEQAS-----RFPE-----DEALLKEIHahlRHGDGVKDAFVAFVDDV	120

<i>Pseudomonas fluorescens</i>	QKAYNRALGLAQP---IHIDTGPMEIPLPAIKGIGGAPPLYLIDRFEGG	134
<i>Avena sativa</i>	AEAFRVSVAGGARPAFAPADLG---HGFLAEVELYGDVVLRFVSYPDET	190
<i>Avena sativa</i>	AEAFRVSVAGGARPAFAPADLG---HGFLAEVELYGDVVLRFVSYPDET	191
<i>Zea mays</i>	EADFRASVAGGARPAFGPVDLG---RGFLAEVELYGDVVLRYVSPDGA	191
<i>Streptomyces avermitilis</i>	RAAHAYAIEHGARSVAEPLYLKDEHGTVVLAAIATYGDKTRHTLVDRTGYD	159
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ESAFSISVANGAIPSPPIVLN---EAVTIAEVKLYGDVVLRYVSYKAED	196
<i>Hordeum vulgare</i>	AEAFRASRRRGARPAFAPVDLG---RGFAFAEVELYGDVVLRFVSHPDGT	185
<i>Daucus carota</i>	AAAFEASVARGARPASAPVELD---DQANLAEVELYGDVVLRFVSGFREG	191
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	LAVYENAVANGAESVSPHDTSCDEGDVISAIAIKTYGDTTHTFIQRTTYT	191
<i>Coccidioides immitis</i>	ESVFSAAVRNGAEVVSVDRTVEDEDDGQIKMATIRTYGETHTHLIERSGYR	170

```

Pseudomonas_fluorescens      S--SIYDIDFVYLEG---VERNVPVAGLKVVIDHLTHNVYRGRMVYWANFY 179
Avena_sativa                  D--LPFLPGFERVS-----SPGAVDYGLTRFDHVVGNN--VPEMAPVIDYM 231
Avena_sativa                  D--LPFLPGFERVS-----SPGAVDYGLTRFDHVVGNN--VPEMAPVIDYM 232
Zea_mays                      AG-EPFLPGFEGVA-----SPGAADYGLSRFDHIVGN--VPELAPAAAYF 233
Streptomyces_avermitilis     G---PYLPGYVAAAPIVEPPAHR---TFQAIDHCVGNNELGRMNEWVGFY 203
Arabidopsis_thaliana         TEKSEFLPGFERVEDA--SSFP-LDYGIRRLDHAVGN--VPELGPALTYV 241
Hordeum_vulgare               D--VPFLPGFEGVT-----NPDADVYGLTRFDHVVGNN--VPELAPAAAYI 226
Daucus_carota                 ---GLFLPGFEAVEGT--ASFPLDYGIRRLDHAVGN--VTELGPVVEYI 234
Mycosphaerella_graminicola   G---PFLPGYRSCTTVDSSANKFLPPVNLEAIDHCVGNNQDWDSDACDFY 238
Coccicoides_immitis          G---GFMPGYRMESNADATSKFLPKVVLERIDHCVGNNQDWDDEMERVCYY 217
                                :  . :                               :  : * . * . :  :

Pseudomonas_fluorescens      EKLFNFREARYF---DIKGEYTGLTSKAMSAPDGMIRIPLNE--ESSKA 224
Avena_sativa                  KGFLGFHEFAEFTAEDVGTTESGLNSVVLANNSEAVLLPLNEPVHGTKRK 281
Avena_sativa                  KGFLGFHEFAEFTAEDVGTTESGLNSVVLANNSEAVLLPLNEPVHGTKRK 282
Zea_mays                      AGFTGFHEFAEFTTEDVGTAEGLNSMVLANNSENVLLPLNEPVHGTKRK 283
Streptomyces_avermitilis     NKVMGFTNMKEFVGDDIATEYSALMSKVVDGTLKVKFPINEPALAKK-K 252
Arabidopsis_thaliana         AGFTGFHQFAEFTADDVGTAEGLNSAVLASNDEMVLPLINEPVHGTKRK 291
Hordeum_vulgare               AGFTGFHEFAEFTAEDVGTTESGLNSVVLANNSEGVLLPLNEPVHGTKRK 276
Daucus_carota                 KGFTGFHEFAEFTAEDVGTLESGLNSVVLANNSEMVLLPLNEPVYGTKRK 284
Mycosphaerella_graminicola   ERCLGFHRFWSVDDKDICTEF SALKSIVMSSPNQVVKMPINEPAHGKK-K 287
Coccicoides_immitis          EKILGFHRFWSVDDKDICTEF SALKSIVMASPNDIVKMPINEPAKGKK-Q 266
                                . * . . * : . : * * : : : * : * : *

Pseudomonas_fluorescens      GQIEEFLMQFNNGEGIQHVAFLTDDLVTWDAKKIG---MRFMTAPPDT 270
Avena_sativa                  SGIQTYLEYHGGPGVQHIALASNDVLRITLREMRARTPMGGFEFMAPPOAK 331
Avena_sativa                  SGIQTYLEYHGGPGVQHIALASNDVLRITLREMRARTPMGGFEFMAPPOAK 332
Zea_mays                      SGIQTFLDHGGPGVQHIALASDDVLRITLREMQARSAMGGFEFMAPPTSD 333
Streptomyces_avermitilis     SQIDEYLEFYGGAGVQHIALNTGDIVETVRTMRAA---GVQFLDTP-DS 297
Arabidopsis_thaliana         SGIQTYLEHNAGAGLQHLALMSEDI FRTLREMRKRSSIGGDFMPSPPPT 341
Hordeum_vulgare               SGIQTFLEHGGPGVQHIAVASSDVLRLTRKMRARSAMGGDFLPPPLPK 326
Daucus_carota                 SGIQTYLEHNAGAGVQHIALVSEDI FRTLREMRKRSSCLGGFEFMPSPPT 334
Mycosphaerella_graminicola   SQIEEYVDFYNGPGVQHIALRTPNI IEAVSNLRSR---GVEFISVP-DT 332
Coccicoides_immitis          SQIEEYVDFYNGAGVQHIALRTNNI IDAITNLKAR---GTEFIKVP-ET 311
                                . ** : : * * : * : : : : : * : *

Pseudomonas_fluorescens      YYEMLEGRLPDHG---EPVDQLQARGILLDGSSVEGDKRLLQLIFSETL 316
Avena_sativa                  YYEGVRRRIAGDVLS--EEQIKECQELGVLVD---RDDQGVLLQIFTKPV 375
Avena_sativa                  YYEGVRRRIAGDVLS--EEQIKECQELGVLVD---RDDQGVLLQIFTKPV 376
Zea_mays                      YYDGVRRRAGDVLT--EAQIKECQELGVLVD---RDDQGVLLQIFTKPV 377
Streptomyces_avermitilis     YYDTLGWEVGDVLT---RVPVDTLRELKILAD---RDEGYYLLQIFTKPV 339
Arabidopsis_thaliana         YYQNLKKRVGDVLS--DDQIKECEELGILVD---RDDQGTLLQIFTKPL 385
Hordeum_vulgare               YYEGVRRLAGDVLS--EAQIKECQELGVLVD---RDDQGVLLQIFTKPV 370
Daucus_carota                 YYKNLKNRVGDVLS--DEQIKECEDLGILVD---RDDQGTLLQIFTKPV 378
Mycosphaerella_graminicola   YYENMRLRLKAAGMKLEESFDIIQKLNLID---FDEGGYLLQLFTKPL 378
Coccicoides_immitis          YYEDMKIRLKRQGLVLEDEDFETLKSILID---FDENGYLLQLFTKHL 357
                                ** . : .. . : * * . : *** : : :

```

Фиг.1B

Fig. 1C