



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,  
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



**(11) BR 122020004875-1 B1**

**(22) Data do Depósito:** 15/10/2015

**(45) Data de Concessão:** 30/01/2024

**(54) Título:** MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO RECOMBINANTE, POLINUCLEOTÍDEO, PROTEÍNA INSETICIDA QUIMÉRICA, CÉLULA HOSPEDEIRA, COMPOSIÇÃO INIBIDORA DE INSETOS, E MÉTODOS PARA CONTROLAR UMA PRAGA DE LEPIDÓPTEROS

**(51) Int.Cl.:** C07K 14/325; C12N 15/82.

**(30) Prioridade Unionista:** 16/10/2014 US 62/064,989.

**(73) Titular(es):** MONSANTO TECHNOLOGY LLC.

**(72) Inventor(es):** JAMES A. BAUM; THOMAS A. CERRUTI; CRYSTAL L. DART; LEIGH H. ENGLISH; XIAORAN FU; VICTOR M. GUZOV; ARLENE R. HOWE; JAY P. MORGENSTERN; JAMES K. ROBERTS; SARA A. SALVADOR; JINLING WANG; STANISLAW FLASINSKI.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2015055800 de 15/10/2015

**(87) Publicação PCT:** WO 2016/061391 de 21/04/2016

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 11/03/2020

**(62) Pedido Original do Dividido:** BR112017007794-9 - 15/10/2015

**(57) Resumo:** A presente invenção refere-se a sequências de nucleotídeos que codificam novas proteínas inseticidas quiméricas que exibem atividade inibidora de lepidópteros. Modalidades particulares proporcionam composições e plantas, partes de plantas, sementes transformadas contendo as moléculas de ácido nucleico recombinante, que codificam uma ou mais dentre as proteínas inseticidas quiméricas.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
**"MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO RECOMBINANTE, POLINUCLEOTÍDEO, PROTEÍNA INSETICIDA QUIMÉRICA, CÉLULA HOSPEDEIRA, COMPOSIÇÃO INIBIDORA DE INSETOS, E MÉTODOS PARA CONTROLAR UMA PRAGA DE LEPIDÓPTEROS".**

Dividido do BR112017007794-9, depositado em 15.10.2015.

### **REFERÊNCIA AO PEDIDO RELACIONADO**

[001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório nº de Série US 62/064,989 depositado em 16 de março de 2016 o qual é incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

### **INCORPORAÇÃO DE LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS**

[002] Uma forma legível por computador de uma Listagem de Sequências é depositada com este pedido por apresentação eletrônica e é incorporada a este pedido por referência em sua totalidade. A Listagem de Sequências está contida no arquivo criado em 23 de agosto de 2016, sob o nome do arquivo P34230WO00\_Seq\_PCT\_Art34.txt, e que tem 898.229 bytes de tamanho (medido no sistema operacional MS-Windows®).

### **CAMPO DA INVENÇÃO**

[003] A invenção se refere, em geral, ao campo de proteínas inibidoras de insetos. Uma classe inovadora de proteínas de inseticidas quiméricas que exibem atividade inibidora de insetos contra pragas relevantes para agricultura de plantas e sementes cultivadas é divulgada. Em particular, a classe divulgada de proteínas exibe atividade inseticida contra a ordem Lepidoptera de pragas de insetos. As plantas, partes de plantas e sementes que contém uma molécula de ácido nucleico recombinante que codifica uma ou mais dentre as proteínas de toxina descritas são fornecidos.

### **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

[004] Aprimorando a produtividade dos cultivos de plantas agricolarmente significativas, que inclui, entre outros, milho, soja, cana-de-açúcar, arroz, trigo, legumes e algodão, têm se tornado cada vez mais importante. Além da necessidade crescente de produtos agrícolas para alimentar, vestir e fornecer energia para uma população humana crescente, efeitos relacionados ao clima e pressão da crescente população para usar a terra para outros propósitos além das práticas agrícolas são previstos para reduzir a quantidade de terra arável disponível para a agricultura. Estes fatores levaram a previsões sombrias no que diz respeito à segurança alimentar, particularmente na ausência de grandes aprimoramentos em biotecnologia vegetal e práticas agronômicas. À luz dessas pressões, os aprimoramentos ambientalmente sustentáveis em tecnologia, técnicas agrícolas e gerenciamento de pragas são ferramentas vitais para expandir a produção de cultivo na quantidade limitada de terra arável disponível para a agricultura.

[005] Insetos, particularmente insetos dentro da ordem Lepidoptera, são considerados uma das principais causas de danos a culturas de campo, diminuindo assim o rendimento das culturas em áreas infestadas. Espécies de praga de Lepidópteros que impactam negativamente a agricultura são, porém, sem limitação, lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), lagarta-da-beterraba (*Spodoptera exigua*), lagarta-bertha (*Mamestra configurata*), lagarta-negra (*Agrotis ipsilon*), lagarta-da-couve (*Trichoplusia ni*), lagarta-da-soja (*Chrysodeixis includens*), lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*), lagarta do trevo verde (*Hypena scabra*), lagarta-do-tabaco (*Heliothis virescens*), lagarta-rosca subterrânea (*Agrotis subterranea*), lagarta-dos-cereais (*Pseudaletia unipuncta*), lagarta-rosca ocidental (*Agrotis orthogonia*), broca-do-milho Europeia (*Ostrinia nubilalis*), lagarta-laranja (*Amyelois transitella*), verme-da-raiz-do-milho (*Crambus caliginosellus*),

verme-da-teia-dos-gramados (*Herpetogramma licarsialis*), traça-do-girassol (*Homoeosoma electellum*), lagarta-elasmo (*Elasmopalpus lignosellus*), mariposa-das-maçãs (*Cydia pomonella*), traça-da-uva (*Endopiza viteana*), traça-oriental (*Grapholita molesta*), traça-do-botão-do-girassol (*Suleima helianthana*), traça-da-couve (*Plutella xylostella*), traça das crucíferas (*Pectinophora gossypiella*), broca-do-caule-rosa (*Sesamia inferens*), mariposa-cigana (*Lymantria dispar*), lagarta-da-folha-do-algodoeiro (*Alabama argillacea*), lagarta-das-folhas-das-árvores-frutíferas (*Archips argyrospila*), traça tortricídea dos arbustos (*Archips rosana*), broca-do-arroz-asiático ou broca-do-colmo-do-arroz (*Chilo suppressalis*), enrolador-da-folha (*Cnaphalocrosis medinalis*), verme-de-teia-da-raiz-do-milho (*Crambus caliginosellus*), verme-de-teia-de-capim-do-campo (*Crambus teterrellus*), broca-grande-do-milho (*Diatraea grandiosella*), broca-grande-da-cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*), lagarta-espinhosa (*Earias insulana*), lagarta-da-maçã (*Earias vittella*), lagarta helicoverpa (*Helicoverpa armigera*), lagarta-do-milho, lagarta-da-soja ou lagarta-do-algodão (*Helicoverpa zea*), verme-da-teia-dos-gramados (*Herpetogramma licarsialis*), traça-da-uva (*Lobesia botrana*), lagarta-mineira (*Phyllocnistis citrella*), borboleta-branca-da-couve (*Pieris brassicae*), borboleta-pequena-da-couve (*Pieris rapae*), larva-do-tabaco ou curuquerê-oriental (*Spodoptera litura*), e traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*).

[006] Historicamente, a aplicação intensiva de inseticidas químicos sintéticos foi invocada como o agente de controle de pragas na agricultura. Preocupações com o meio ambiente e a saúde humana, além de problemas de resistência emergentes, estimulou a pesquisa e o desenvolvimento de pesticidas biológicos. Este esforço de investigação resultou na constatação e no uso progressivos de várias espécies microbianas entomopatogênicas, que inclui bactérias.

[007] O paradigma de controle biológico foi alterado quando o potencial de bactérias entomopatogênicas, especialmente, bactérias pertencentes ao gênero *Bacilo*, foi constado e desenvolvido como um agente biológico de controle de pragas. As cepas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) foram usadas como uma fonte de proteínas insecticidas uma vez que foi constatado que cepas de *Bt* mostram uma alta toxicidade contra insetos específicos. As cepas *Bt* são conhecidas por produzir delta-endotoxinas que são localizadas dentro de corpos de inclusão cristalinos parasporais no estabelecimento da esporulação e durante a fase de crescimento estacionária (por exemplo, proteínas Cry) e também são conhecidas por produzir proteína inseticida secretada. Após a ingestão por um inseto suscetível, a delta-endotoxinas, bem como toxinas secretadas exercem seus efeitos na superfície do epitélio do intestino médio, rompendo a membrana celular, levando a ruptura de célula e morte. Os genes que codificam proteínas insecticidas também foram identificados em espécies bacterianas diferentes de *Bt*, incluindo outros *Bacilo* e uma diversidade de outras espécies bacterianas, tais como *Brevibacillus laterosporus*, *Lysinibacillus sphaericus* ("Ls" anteriormente conhecido como *Bacillus sphaericus*) e *Paenibacillus popilliae*.

[008] Toxinas de proteína inseticida secretadas e cristalinas são altamente específicas para seus hospedeiros e receberam aceitação mundial como alternativas aos inseticidas químicos. Por exemplo, proteínas de toxinas inseticidas têm sido empregados em diversas aplicações agrícolas para proteger plantas agronomicamente importantes contra infestações de insetos, diminuir a necessidade por aplicação de pesticidas químicos e aumentar o rendimento. Proteínas de toxinas insecticidas são usadas para controlar as pragas agronomicamente relevantes de plantas de cultura por métodos mecânicos, tais como a aspersão para dispersar formulações microbianas contendo várias

cepas de bactérias sobre as superfícies de plantas, e usando técnicas de transformação genética para produzir plantas e sementes transgênicas que expressam a proteína de toxina inseticida.

[009] O uso de plantas transgênicas que expressa proteínas inseticidas *tem* sido adotado globalmente. Por exemplo, em 2012, foram plantados 26,1 milhões de hectares com culturas transgênicas que expressam toxinas *Bt* (James, C., Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012. ISAAA Resumo nº 44). O uso global de culturas transgênicas protegidas contra insetos e o número limitado de proteínas inseticidas usadas nestas culturas criaram uma pressão de seleção para os alelos de insetos existentes que conferem resistência às proteínas inseticida usadas atualmente.

[0010] O desenvolvimento de resistência em pragas-alvo a proteínas inseticidas cria a necessidade contínua por constatação e desenvolvimento de novas formas de proteínas inseticidas que são úteis para gerir o aumento da resistência a insetos aos cultivos transgênicos que expressam proteínas inseticidas. Novas proteínas insecticidas com eficácia aprimorada e que exibem controle ao longo de um espectro mais amplo de espécies de insetos sensíveis irá reduzir o número de insetos que sobrevivem que podem desenvolver alelos de resistência. Além disso, o uso numa planta de duas ou mais proteínas insecticidas transgênicas tóxicos para a mesma praga de insetos e exibir modos de ação diferentes reduz a probabilidade de resistência em qualquer espécie de inseto-alvo único.

[0011] Consequentemente, existe uma necessidade crítica para identificar proteínas inseticidas adicionais com propriedades inseticidas aprimoradas, tais como eficácia aumentada contra um espectro mais amplo de espécies de pragas de inseto alvo e modos de ação diferentes em comparação às toxinas usadas atualmente em práticas agrícolas. Para satisfazer esta necessidade, a presente invenção descreve

proteínas inseticidas químéricas Cry1 inovadoras que exibem atividade contra espécies importantes de pragas de Lepidópteros alvo.

[0012] Os membros da família de proteínas de cristal Cry1 são conhecidos na técnica por exibir bioatividade contra pragas de Lepidópteros. A forma precursora de proteínas de cristal Cry 1 consiste em dois segmentos de tamanhos aproximadamente iguais. A porção carbóxi-terminal da proteína precursora, conhecida como o segmento protóxina, estabiliza a formação de cristais e exibe nenhuma atividade inseticida. A metade amino-terminal da proteína precursora compreende o segmento de toxina da proteína Cry1 e, com base no alinhamento de sequências conservadas ou substancialmente conservadas nos membros da família Cry1, pode estar ainda subdividido em três domínios estruturais, domínio I, domínio II e domínio III. O domínio I compreende cerca do primeiro terço do segmento de toxina ativa e tem sido demonstrado como essencial para a formação de canais. Os domínios II e III têm, ambos, sido implicados na ligação de receptor e especificidade de espécie de inseto, dependendo do inseto e da proteína inseticida a ser examinada.

[0013] A probabilidade de criar arbitrariamente uma proteína químérica com propriedades melhoradas da variedade das estruturas de domínio das numerosas proteínas inseticidas nativas conhecidas na técnica é remota. Este é um resultado da natureza complexa da estrutura proteica, oligomerização e ativação (incluindo processamento proteolítico correto do precursor químérico, se expressado de tal forma) exigido para liberar um segmento de proteína inseticida. Apenas através da seleção cuidadosa de protóxinas e alvos específicos dentro de cada proteína parental para a criação de uma estrutura químérica as toxinas, toxinas inseticidas químéricas funcionais podem ser construídas, as quais exibem atividade inseticida melhorada em comparação às proteínas parentais a partir dos quais as quimeras são derivadas. É

conhecido na técnica que a remontagem dos domínios I, II e III de protoxina e toxina de quaisquer duas ou mais toxinas que são diferentes umas das outras, muitas vezes resultam na construção de proteínas que exibem a formação de cristais com ausência completa de qualquer atividade inseticida detectável direcionada para uma espécie de pragas de insetos alvo preferida. Apenas por tentativa e erro as quimeras inseticidas eficazes são projetadas, e mesmo assim, o versado na técnica não pode garantir que obterá uma quimera que exibe atividade inseticida que é equivalente ou aprimorada em comparação a uma única proteína de toxina parental a partir da qual a protoxina constituinte ou domínios de toxina da quimera podem ter sido derivados. Por exemplo, a literatura relata numerosos exemplos de construção ou montagem de proteínas quiméricas a partir de dois ou mais precursores de proteína de cristal. Consultar, por exemplo. Jacqueline S. Knight, *et al.* "A Strategy for Shuffling Numerous *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein Domains". *J. Economic Entomology*, 97 (6) (2004): páginas 1.805 a 1.813; Bosch, *et al* (Patente nº U.S.6204246); Malvar e Gilmer (Patente nº U.S.6017534). Em cada um destes exemplos, muitas das quimeras resultantes não exibiram propriedades inseticidas ou formadoras de cristal que fossem equivalentes ou melhoradas, em comparação às proteínas precursoras a partir das quais os componentes das quimeras foram derivados.

## **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

[0014] As moléculas de ácido nucleico recombinantes são fornecidas em que codificam proteínas inseticidas quiméricas tóxicas para espécie de Lepidópteros de pragas de plantas. Cada uma dentre as proteínas inseticidas quiméricas pode ser usada isoladamente ou umas em combinação com as outras e com outras proteínas inseticidas e agentes inibidores de insetos em formulações e *in planta*; deste modo, fornecendo alternativas às proteínas inseticidas e químicas de

inseticidas atualmente em uso em sistemas agrícolas.

[0015] Em certas modalidades descritas no presente documento, uma proteína inseticida quimérica compreende uma sequência de aminoácidos conforme estabelecido em qualquer uma dentre as SEQ ID NOs: 21, 10, 28, 7, 4, 13, 16, 19, 23, 25, 30, 33, 36, 39, 41, 43, 45, 47, 50, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 ou 111. Esta proteína insecticida quimérica exibe atividade inibidora contra uma espécie de inseto da ordem Lepidopteras tais como, porém, sem limitação, *Anticarsia gemmatalis*, *Diatraea saccharalis*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens*, *Chrysodeixis includens*, *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura*, *Pectinophora gossypiella*, *Diatraea grandiosella*, *Earias vitella*, *Helicoverpa gelotopeon* e *Rachiplusia nu*.

[0016] Em outra modalidade, é divulgado um polinucleotídeo que codifica uma proteína inseticida quimérica, em que o polinucleotídeo é ligado de modo operativo a um promotor heterólogo e a proteína inseticida quimérica compreende a sequência de aminoácidos conforme estabelecido em qualquer uma dentre as SEQ ID NOs: 21, 10, 28, 7, 4, 13, 16, 19, 23, 25, 30, 33, 36, 39, 41, 43, 45, 47, 50, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 ou 111. Também é contemplado um polinucleotídeo que codifica uma proteína inseticida quimérica, em que o polinucleotídeo compreende uma sequência de nucleotídeos que opcionalmente: se hibridiza sob condições rigorosas com o complemento inverso da sequência de polinucleotídeo como estabelecido em qualquer uma dentre as SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 27, 29, 31, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 49, 51, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74,

76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129 ou 130; ou codifica a proteína inseticida quimérica que compreende uma sequência de aminoácidos conforme estabelecido em qualquer uma dentre as SEQ ID NOs: 21, 10, 28, 7, 4, 13, 16, 19, 23, 25, 30, 33, 36, 39, 41, 43, 45, 47, 50, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 ou 111.

[0017] Em outras modalidades divulgadas no presente documento, uma célula hospedeira que compreende o polinucleotídeo conforme estabelecido de em qualquer uma dentre as SEQ ID NO: 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 27, 29, 31, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 49, 51, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, or 130, em que a célula hospedeira é selecionada a partir do grupo que consiste numa célula hospedeira bacteriana ou uma célula hospedeira vegetal. As células hospedeiras bacterianas contempladas incluem *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Erwinia*, em que a espécie *Bacillus* é uma *Bacillus cereus* ou uma *Bacillus thuringiensis*, a referida *Brevibacillus* é uma *Brevibacillus laterosperous* e a referida *Escherichia* é uma *Escherichia coli*. As células de plantas contempladas incluem monocotiledôneas e dicotiledôneas.

[0018] Outras modalidades divulgadas no presente incluem composições inibidoras de insetos que compreendem uma proteína inseticida quimérica que compreende uma sequência de aminoácidos conforme estabelecido em qualquer uma dentre as SEQ ID NOs: 21, 10, 28, 7, 4, 13, 16, 19, 23, 25, 30, 33, 36, 39, 41, 43, 45, 47, 50, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95,

97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 ou 111. Em certas modalidades, a composição inibidora de insetos compreende ainda pelo menos um agente inibidor de insetos diferente da proteína inseticida quimérica. Os agentes inibidores de insetos contemplados diferentes da proteína inseticida quimérica incluem uma proteína inibidora de inseto, uma molécula de dsRNA inibidora de insetos e uma química inibidora de insetos. Estes agentes inibidores de inseto diferentes da proteína inseticida quimérica podem exibir atividade contra uma ou mais espécies de pragas das ordens Lepidópteros, Coleoptera, Hemiptera, Homoptera ou Thysanoptera.

[0019] Em ainda outra modalidade divulgada no presente documento, uma semente que compreende uma quantidade eficaz inibidora de insetos de: uma proteína inseticida quimérica que compreende a sequência de aminoácidos conforme estabelecido em qualquer uma dentre as SEQ ID NOs: 21, 10, 28, 7, 4, 13, 16, 19, 23, 25, 30, 33, 36, 39, 41, 43, 45, 47, 50, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 ou 111; ou um polinucleotídeo conforme estabelecido em qualquer uma dentre as SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 27, 29, 31, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 49, 51, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129 ou 130.

[0020] Também são contemplados métodos para controlar ma praga de Lepidópteros compreendem colocar a praga de Lepidópteros em contato com uma quantidade inibidora de uma proteína inseticida quimérica da invenção.

[0021] Em outra modalidade, divulgada no presente documento, uma célula de planta, planta ou parte da planta transgênica que

compreende uma proteína inseticida quimérica, em que: a proteína inseticida quimérica compreende qualquer sequência de aminoácidos estabelecida em qualquer uma dentre as SEQ ID NOs: 21, 10, 28, 7, 4, 13, 16, 19, 23, 25, 30, 33, 36, 39, 41, 43, 45, 47, 50, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, or 111; ou a proteína inseticida quimérica que compreende uma proteína que é: pelo menos 94% idêntica à SEQ ID NOs: 21, 10; pelo menos 93% idêntica à SEQ ID NO: 28, pelo menos 87% idêntica à SEQ ID NO: 7; pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 4; pelo menos 91% idêntica à SEQ ID NO: 13; pelo menos 64% idêntica à SEQ ID NO: 16; pelo menos 66% idêntica à SEQ ID NO: 19; pelo menos 86% idêntica à SEQ ID NO: 23; pelo menos 91% idêntica à SEQ ID NO: 25; pelo menos 94% idêntica à SEQ ID NO: 30; pelo menos 91% idêntica à SEQ ID NO: 33; pelo menos 64% idêntica à SEQ ID NO: 36; pelo menos 66% idêntica à SEQ ID NO: 39; pelo menos 94% idêntica à SEQ ID NO: 41; pelo menos 84% idêntica à SEQ ID NO: 43; pelo menos 93% idêntica à SEQ ID NO: 45; pelo menos 94% idêntica à SEQ ID NO: 47; pelo menos 91% idêntica à SEQ ID NO: 50; ou, pelo menos, 93% idêntica à SEQ ID NO: 53; ou pelo menos 87% idêntica a SEQ ID NOs: 85, 93, 105; ou pelo menos 85% idêntica a SEQ ID NOs: 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79; ou pelo menos 88% idêntica a SEQ ID NOs: 91, 87, 89; ou pelo menos 89% idêntica a SEQ ID NOs: 107, 111; ou pelo menos 90% idêntica a SEQ ID NO: 97; ou pelo menos 91% idêntica a SEQ ID NO: 109; ou pelo menos 93% idêntica a SEQ ID NO: 83; ou pelo menos 94% idêntica a SEQ ID NOs: 91 ou 103; ou pelo menos 95% idêntica a SEQ ID NOs: 95, 101; ou pelo menos 98% idêntica a SEQ ID NO: 99. Também são contemplados métodos de controlo de uma praga de Lepidópteros que compreendem a exposição da praga a esta célula de planta, planta ou parte da planta transgênica, em que a referida célula de planta, planta ou parte da

planta expressa uma quantidade inibidora Leptdoptera da proteína inseticida quimérica.

[0022] Em outras modalidades descritas no presente documento, são fornecidos os produtos de bens de consumo derivados das matérias-primas da célula de planta, planta ou parte de planta, em que o produto compreende uma quantidade detectável da proteína inseticida quimérica. Os produtos de bens de consumo contemplado incluem biomassa vegetal, óleo, farelo, ração animal, farinha, flocos, farelo de trigo, fiapos, cascas e sementes processadas.

[0023] Um outro método aqui descrito é um método de produção de uma semente que compreende a proteína inseticida quimérica, o método compreendendo: plantar pelo menos uma semente que compreende a proteína inseticida quimérica; cultivar plantas a partir da referida semente; e colher sementes das plantas, em que a referida semente colhida compreende a proteína inseticida quimérica.

[0024] As moléculas de polinucleotídeo recombinante que codificam uma proteína inseticida quimérica, que compreende uma sequência de nucleotídeos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 27, 29, 31, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 49, 51, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129 ou 130; e, opcionalmente, uma sequência de polinucleotídeos que codifica um agente inibidor de insetos diferente da proteína inseticida quimérica também são contempladas no presente documento.

[0025] Outra molécula de ácido nucleico recombinante contemplada no presente documento compreende um promotor heterólogo operacionalmente ligado a um segmento de polinucleotídeo que codifica proteínas inseticidas quiméricas, em que: a proteína inseticida

quimérica compreende qualquer sequência de aminoácidos estabelecida em qualquer uma dentre as SEQ ID NOs: 21, 10, 28, 7, 4, 13, 16, 19, 23, 25, 30, 33, 36, 39, 41, 43, 45, 47, 50, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 ou 111; ou a proteína insecticida quimérica compreende uma proteína que possui: pelo menos 94% idêntica à SEQ ID NOs: 21, 10; pelo menos 93% idêntica à SEQ ID NO: 28; pelo menos 87% idêntica à SEQ ID NO: 7; pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 4; pelo menos 91% idêntica à SEQ ID NO: 13; pelo menos 64% idêntica à SEQ ID NO: 16; pelo menos 66% idêntica à SEQ ID NO: 19; pelo menos 86% idêntica à SEQ ID NO: 23; pelo menos 91% idêntica à SEQ ID NO: 25; pelo menos 94% idêntica à SEQ ID NO: 30; pelo menos 91% idêntica à SEQ ID NO: 33; pelo menos 64% idêntica à SEQ ID NO: 36; pelo menos 66% idêntica à SEQ ID NO: 39; pelo menos 94% idêntica à SEQ ID NO: 41; pelo menos 84% idêntica à SEQ ID NO: 43; pelo menos 93% idêntica à SEQ ID NO: 45; pelo menos 94% idêntica à SEQ ID NO: 47; pelo menos 91% idêntica à SEQ ID NO: 50; ou, pelo menos, 93% idêntica à SEQ ID NO: 53; ou pelo menos 87% idêntica a SEQ ID NOs: 85, 93, 105; ou pelo menos 85% idêntica a SEQ ID NOs: 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79; ou pelo menos 88% idêntica a SEQ ID NOs: 91, 87, 89; ou pelo menos 89% idêntica a SEQ ID NOs: 107, 111; ou pelo menos 90% idêntica a SEQ ID NO: 97; ou pelo menos 91% idêntica a SEQ ID NO: 109; ou pelo menos 93% idêntica a SEQ ID NO: 83; ou pelo menos 94% idêntica a SEQ ID NOs: 91, 103; ou pelo menos 95% idêntica a SEQ ID NOs: 95, 101; ou pelo menos 98% idêntica a SEQ ID NO: 99; ou o segmento de polinucleotídeo se hibridiza com um polinucleotídeo que tem uma sequência de nucleotídeos conforme estabelecido em qualquer uma dentre as SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 27, 29, 31, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 49, 51, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70,

72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129 ou 130.

[0026] Outras modalidades, recursos e vantagens da invenção se tornarão evidentes a partir da seguinte descrição detalhada, exemplos e reivindicações.

### **BREVE DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS**

[0027] SEQ ID NO: 1 é uma sequência de DNA recombinante que codifica TIC1100 usado para a expressão numa célula bacteriana.

[0028] SEQ ID NO: 2 é uma sequência de DNA que codifica TIC1100 sintético para a expressão numa célula vegetal.

[0029] SEQ ID NO: 3 é uma sequência de DNA que codifica TIC1100 sintético para a expressão numa célula vegetal.

[0030] SEQ ID NO: 4 é a sequência de aminoácidos de TIC1100.

[0031] SEQ ID NO: 5 é uma sequência de DNA que codifica TIC860 recombinante usada para a expressão numa célula bacteriana.

[0032] SEQ ID NO: 6 é uma sequência de DNA que codifica TIC860 sintético para a expressão numa célula vegetal.

[0033] SEQ ID NO: 7 é a sequência de aminoácidos de TIC860.

[0034] SEQ ID NO: 8 é uma sequência de DNA que codifica TIC867 recombinante usada para a expressão numa célula bacteriana.

[0035] SEQ ID NO: 9 é uma sequência de DNA que codifica TIC867 sintético para a expressão numa célula vegetal.

[0036] SEQ ID NO: 10 é a sequência de aminoácidos de TIC867.

[0037] SEQ ID NO: 11 é uma sequência de DNA que codifica TIC867\_20 recombinante usada para a expressão numa célula bacteriana.

[0038] SEQ ID NO: 12 é uma sequência de DNA que codifica TIC867\_20 sintético para a expressão numa célula vegetal.

[0039] SEQ ID NO: 13 é a sequência de aminoácidos de

TIC867\_20.

[0040] SEQ ID NO: 14 é uma sequência de DNA que codifica TIC867\_21 recombinante usada para a expressão numa célula bacteriana.

[0041] SEQ ID NO: 15 é uma sequência de DNA que codifica TIC867\_21 sintético para a expressão numa célula vegetal.

[0042] SEQ ID NO: 16 é a sequência de aminoácidos de TIC867\_21.

[0043] SEQ ID NO: 17 é uma sequência de DNA que codifica TIC867\_22 recombinante usada para a expressão numa célula bacteriana.

[0044] SEQ ID NO: 18 é uma sequência de DNA que codifica TIC867\_22 sintético para a expressão numa célula vegetal.

[0045] SEQ ID NO: 19 é a sequência de aminoácidos de TIC867\_22.

[0046] SEQ ID NO: 20 é uma sequência de DNA que codifica TIC867\_23 sintético para a expressão na célula vegetal.

[0047] SEQ ID NO: 21 é a sequência de aminoácidos de TIC867\_23.

[0048] SEQ ID NO: 22 é uma sequência de DNA que codifica TIC867\_24 sintético para a expressão numa célula vegetal.

[0049] SEQ ID NO: 23 é a sequência de aminoácidos de TIC867\_24.

[0050] SEQ ID NO: 24 é uma sequência de DNA que codifica TIC867\_24 sintético para a expressão numa célula vegetal.

[0051] SEQ ID NO: 25 é a sequência de aminoácidos de TIC867\_25.

[0052] SEQ ID NO: 26 é uma sequência de DNA que codifica TIC868 recombinante usada para a expressão numa célula bacteriana.

[0053] SEQ ID NO: 27 é uma sequência de DNA que codifica

TIC868 sintético para a expressão numa célula vegetal.

[0054] SEQ ID NO: 28 é a sequência de aminoácidos de TIC868.

[0055] SEQ ID NO: 29 é uma sequência de DNA que codifica TIC868\_9 sintético para a expressão numa célula vegetal.

[0056] SEQ ID NO: 30 é a sequência de aminoácidos de TIC868\_9.

[0057] SEQ ID NO: 31 é uma sequência de DNA que codifica TIC868\_10 recombinante usada para a expressão numa célula bacteriana.

[0058] SEQ ID NO: 32 é uma sequência de DNA sintético para a expressão na célula vegetal que codifica a variante TIC868, TIC868\_10.

[0059] SEQ ID NO: 33 é a sequência de aminoácidos de TIC868\_10.

[0060] SEQ ID NO: 34 é uma sequência de DNA que codifica TIC868\_11 recombinante usada para a expressão numa célula bacteriana.

[0061] SEQ ID NO: 35 é uma sequência de DNA que codifica TIC868\_11 sintético para a expressão numa célula vegetal.

[0062] SEQ ID NO: 36 é a sequência de aminoácidos de TIC868\_11.

[0063] SEQ ID NO: 37 é uma sequência de DNA que codifica TIC868\_12 recombinante usada para a expressão numa célula bacteriana.

[0064] SEQ ID NO: 38 é uma sequência de DNA que codifica TIC868\_12 sintético para a expressão numa célula vegetal.

[0065] SEQ ID NO: 39 é a sequência de aminoácidos de TIC868\_12.

[0066] SEQ ID NO: 40 é uma sequência de DNA que codifica TIC868\_13 sintético para a expressão numa célula vegetal.

[0067] SEQ ID NO: 41 é a sequência de aminoácidos de TIC868\_13.

- [0068] SEQ ID NO: 42 é uma sequência de DNA que codifica TIC868\_14 sintético para a expressão numa célula vegetal.
- [0069] SEQ ID NO: 43 é a sequência de aminoácidos de TIC868\_14.
- [0070] SEQ ID NO: 44 é uma sequência de DNA que codifica TIC868\_15 sintético para a expressão numa célula vegetal.
- [0071] SEQ ID NO: 45 é a sequência de aminoácidos de TIC868\_15.
- [0072] SEQ ID NO: 46 é uma sequência de DNA que codifica TIC868\_29 sintético para a expressão numa célula vegetal.
- [0073] SEQ ID NO: 47 é a sequência de aminoácidos de TIC868\_29.
- [0074] SEQ ID NO: 48 é uma sequência de DNA que codifica TIC869 recombinante usada para a expressão numa célula bacteriana.
- [0075] SEQ ID NO: 49 é uma sequência de DNA que codifica TIC869 sintético para a expressão numa célula vegetal.
- [0076] SEQ ID NO: 50 é a sequência de aminoácidos de TIC869.
- [0077] SEQ ID NO: 51 é uma sequência de DNA que codifica TIC836 recombinante usada para a expressão numa célula bacteriana.
- [0078] SEQ ID NO: 52 é uma sequência de DNA que codifica TIC836 sintético para a expressão numa célula vegetal.
- [0079] SEQ ID NO: 53 é a sequência de aminoácidos de TIC836.
- [0080] SEQ ID NO: 54 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminoácidos TIC713 quimérica.
- [0081] SEQ ID NO: 55 é a sequência de aminoácidos de TIC713 traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 54.
- [0082] SEQ ID NO: 56 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminácidos TIC843 quimérica.
- [0083] SEQ ID NO: 57 é a sequência de aminácidos TIC843

traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 56.

[0084] SEQ ID NO: 58 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminácidos TIC862 quimérica.

[0085] SEQ ID NO: 59 é a sequência de aminácidos TIC862 traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 58.

[0086] SEQ ID NO: 60 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminácidos TIC1099 quimérica.

[0087] SEQ ID NO: 61 é a sequência de aminácidos TIC1099 traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 60.

[0088] SEQ ID NO: 62 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminácidos TIC1099-T507E quimérica.

[0089] SEQ ID NO: 63 é a sequência de aminácidos TIC1099-T507E traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 62.

[0090] SEQ ID NO: 64 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminácidos TIC1099-R522K quimérica.

[0091] SEQ ID NO: 65 é a sequência de aminácidos TIC1099-R522K traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 64.

[0092] SEQ ID NO: 66 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminácidos TIC1099-K490S quimérica.

[0093] SEQ ID NO: 67 é a sequência de aminácidos TIC1099-K490S traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 66.

[0094] SEQ ID NO: 68 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminácidos TIC1099-T562R quimérica.

[0095] SEQ ID NO: 69 é a sequência de aminácidos TIC1099-

T562R traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 68.

[0096] SEQ ID NO: 70 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminácidos TIC1099-S553R quimérica.

[0097] SEQ ID NO: 71 é a sequência de aminácidos TIC1099-S553R traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 70.

[0098] SEQ ID NO: 72 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminácidos TIC1099-G498D quimérica.

[0099] SEQ ID NO: 73 é a sequência de aminácidos TIC1099-G498D traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 72.

[0100] SEQ ID NO: 74 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminácidos TIC1099-K490A quimérica.

[0101] SEQ ID NO: 75 é a sequência de aminácidos TIC1099-K490A traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 74.

[0102] SEQ ID NO: 76 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminácidos TIC1099-E564A quimérica.

[0103] SEQ ID NO: 77 é a sequência de aminácidos TIC1099-E564A traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 76.

[0104] SEQ ID NO: 78 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminácidos TIC1103 quimérica.

[0105] SEQ ID NO: 79 é a sequência de aminácidos TIC1103 traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 78.

[0106] SEQ ID NO: 80 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminácidos TIC1101 quimérica.

[0107] SEQ ID NO: 81 é a sequência de aminácidos TIC1101

traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 80.

[00108] SEQ ID NO: 82 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminácidos TIC845 quimérica.

[00109] SEQ ID NO: 83 é a sequência de aminácidos TIC845 traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 82.

[00110] SEQ ID NO: 84 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminácidos TIC846 quimérica.

[00111] SEQ ID NO: 85 é a sequência de aminácidos TIC846 traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 84.

[00112] SEQ ID NO: 86 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminácidos TIC858 quimérica.

[00113] SEQ ID NO: 87 é a sequência de aminácidos TIC858 traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 86.

[00114] SEQ ID NO: 88 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminácidos TIC865 quimérica.

[00115] SEQ ID NO: 89 é a sequência de aminácidos TIC865 traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 88.

[00116] SEQ ID NO: 90 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminácidos TIC866 quimérica.

[00117] SEQ ID NO: 91 é a sequência de aminácidos TIC866 traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 90.

[00118] SEQ ID NO: 92 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminácidos TIC838 quimérica.

[00119] SEQ ID NO: 93 é a sequência de aminácidos TIC838

traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 92.

[00120] SEQ ID NO: 94 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminácidos TIC839 quimérica.

[00121] SEQ ID NO: 95 é a sequência de aminácidos TIC839 traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 94.

[00122] SEQ ID NO: 96 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminácidos TIC841.

[00123] SEQ ID NO: 97 é a sequência de aminácidos TIC841 traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 96.

[00124] SEQ ID NO: 98 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminácidos TIC842 quimérica.

[00125] SEQ ID NO: 99 é a sequência de aminácidos TIC842 traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 98.

[00126] SEQ ID NO: 100 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminácidos TIC850.

[00127] SEQ ID NO: 101 é a sequência de aminácidos TIC850 traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 100.

[00128] SEQ ID NO: 102 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminácidos TIC859 quimérica.

[00129] SEQ ID NO: 103 é a sequência de aminácidos TIC859 traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 102.

[00130] SEQ ID NO: 104 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminácidos TIC861 quimérica.

[00131] SEQ ID NO: 105 é a sequência de aminácidos TIC861

traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 104.

[00132] SEQ ID NO: 106 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminácidos TIC848 quimérica.

[00133] SEQ ID NO: 107 é a sequência de aminácidos TIC848 traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 106.

[00134] SEQ ID NO: 108 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminácidos TIC849 quimérica.

[00135] SEQ ID NO: 109 é a sequência de aminácidos TIC849 traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 108.

[00136] SEQ ID NO: 110 é uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminácidos TIC847 quimérica.

[00137] SEQ ID NO: 111 é a sequência de aminácidos TIC847 traduzida a partir da estrutura de leitura aberta estabelecida na SEQ ID NO: 110.

[00138] SEQ ID NO: 112 é uma sequência de DNA sintético para expressão na célula vegetal que codifica TIC713.

[00139] SEQ ID NO: 113 é uma sequência de DNA sintético para expressão na célula vegetal que codifica TIC713.

[00140] SEQ ID NO: 114 é uma sequência de DNA sintético para expressão na célula vegetal que codifica TIC843.

[00141] SEQ ID NO: 115 é uma sequência de DNA sintético para expressão na célula vegetal que codifica TIC862.

[00142] SEQ ID NO: 116 é uma sequência de DNA sintético para expressão na célula vegetal que codifica TIC1099.

[00143] SEQ ID NO: 117 é uma sequência de DNA sintético para expressão na célula vegetal que codifica TIC1103.

[00144] SEQ ID NO: 118 é uma sequência de DNA sintético para

expressão na célula vegetal que codifica TIC845.

[00145] SEQ ID NO: 119 é uma sequência de DNA sintético para expressão na célula vegetal que codifica TIC846.

[00146] SEQ ID NO: 120 é uma sequência de DNA sintético para expressão na célula vegetal que codifica TIC858.

[00147] SEQ ID NO: 121 é uma sequência de DNA sintético para expressão na célula vegetal que codifica TIC866.

[00148] SEQ ID NO: 122 é uma sequência de DNA sintético para expressão na célula vegetal que codifica TIC838.

[00149] SEQ ID NO: 123 é uma sequência de DNA sintético para expressão na célula vegetal que codifica TIC841.

[00150] SEQ ID NO: 124 é uma sequência de DNA sintético para expressão na célula vegetal que codifica TIC842.

[00151] SEQ ID NO: 125 é uma sequência de DNA sintético para expressão na célula vegetal que codifica TIC850.

[00152] SEQ ID NO: 126 é uma sequência de DNA sintético para expressão na célula vegetal que codifica TIC859.

[00153] SEQ ID NO: 127 é uma sequência de DNA sintético para expressão na célula vegetal que codifica TIC861.

[00154] SEQ ID NO: 128 é uma sequência de DNA sintético para expressão na célula vegetal que codifica TIC848.

[00155] SEQ ID NO: 129 é uma sequência de DNA sintético para expressão na célula vegetal que codifica TIC849.

[00156] SEQ ID NO: 130 é uma sequência de DNA sintético para expressão na célula vegetal que codifica TIC847.

## **DESCRÍÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

[00157] O problema na técnica de controle de pragas agrícolas pode ser distinguido como uma necessidade por novas proteínas inseticidas que são eficazes contra as pragas-alvo, exibem toxicidade de amplo espectro contra espécies de praga-alvo, têm a capacidade para serem

expressas em plantas sem causar problemas agronômicos indesejáveis, e fornecem um modo alternativo de ação em comparação às toxinas atuais que são comercialmente usadas nas plantas. As proteínas inseticidas químéricas inovadoras são divulgadas no presente documento e abordam cada uma destas necessidades, particularmente, contra um espectro amplo de pragas de insetos Lepidópteros.

[00158] A fim de evitar o desenvolvimento de, ou contornar a resistência a insetos contra as proteínas insecticidas usadas atualmente, novas proteínas inseticidas com modos de ação (MOA) diferentes, bem como um espectro amplo e eficácia, são necessários para o controle de Lepidópteros. Uma forma de abordar esta necessidade é obter novas proteínas inseticidas de diferentes fontes biológicas, de preferência, a partir de bactérias, fungos ou plantas. Outra abordagem consiste em intercambiar segmentos entre várias proteínas *Bt* que exibem semelhanças estruturais para criar novas proteínas *Bt* com propriedades inibidoras de insetos. A probabilidade de criar uma proteína químérica com propriedades melhoradas da variedade das estruturas de domínio das numerosas proteínas inseticidas nativas conhecidas na técnica é remota. Consultar, por exemplo, Jacqueline S. Knight, *et al.* "A Strategy for Shuffling Numerous *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein Domains". *J. Economic Entomology*, 97 (6) (2004): páginas 1.805 a 1.813.

[00159] Sequências de moléculas de ácido nucleico recombinante que codificam novas proteínas inseticida químéricas são reveladas no presente documento. Estas proteínas inseticidas abordam a necessidade contínua na técnica de preparar proteínas inseticidas tóxicos adicionais com propriedades inseticidas melhoradas tais como eficácia aumentada contra um espectro mais amplo de espécies de praga de inseto alvo e modos de ação diferentes. Os membros deste grupo de proteínas, que incluem as proteínas exemplificativas

divulgadas no presente documento, exibem uma atividade inseticida contra espécies de pragas de insetos Lepidópteros.

[00160] O termo "segmento" ou "fragmento" é utilizado neste pedido para descrever sequências de aminoácidos ou de ácidos nucleicos consecutivas que são mais curtas que a sequência aminoácidos ou ácidos nucleicos completa que descreve uma proteína inseticida quimérica divulgada. Um segmento ou fragmento que exibe atividade inibidora de insetos também é divulgado no presente pedido se o alinhamento de tal segmento ou fragmento, com a seção correspondente da proteína inseticida quimérica, resultar em identidade de sequência de aminoácidos de qualquer porcentagem de fração de cerca de 65 a cerca de 100 por cento entre o segmento ou fragmento e a seção correspondente da proteína inseticida quimérica.

[00161] A referência nesse pedido aos termos "ativo(a)" ou "atividade"; "atividade pesticida" ou "pesticida"; ou "atividade insecticida", "inibidor de inseto", "inseticida", se refere à eficácia de um agente tóxico, tal como uma proteína inseticida, na inibição (inibição do crescimento, alimentação, fecundidade ou viabilidade), na supressão (suprimindo a infestação de pragas, suprimindo as atividades de alimentação de pragas numa cultura particular contendo uma quantidade eficaz de uma proteína inseticida) ou matando (causando a morbidade, a mortalidade ou a fecundidade reduzida de) uma praga. Estes termos se destinam a incluir o resultado do fornecimento de uma quantidade eficaz de uma proteína inseticida a uma praga em que a exposição da praga à proteína inseticida resulta em morbidade, mortalidade, fecundidade reduzida ou retardação do crescimento. Estes termos também incluem a repulsão da praga da planta, de um tecido da planta, de uma parte da planta, da semente, de células vegetais, ou da localização geográfica particular onde a planta pode estar sendo cultivada, como resultado do fornecimento de uma quantidade eficaz

como pesticida da proteína inseticida dentro ou na planta. De um modo geral, atividade pesticida se refere à capacidade de uma proteína inseticida ser eficaz na inibição do crescimento, desenvolvimento, viabilidade, comportamento de alimentação, comportamento de acasalamento, fecundidade ou qualquer diminuição mensurável NOs efeitos adversos causados por uma alimentação de insetos nesta proteína, fragmento de proteína, segmento de proteína ou polinucleotídeo de uma praga-alvo particular, incluindo, sem limitação, insetos da ordem Lepidoptera. A proteína inseticida pode ser produzida pela planta ou pode ser aplicada à planta ou ao ambiente dentro do local onde a planta é localizada. O termo "bioatividade", "eficaz", "eficácia" ou variações dos mesmos também são termos usados intercambiavelmente neste pedido para descrever os efeitos das proteínas inseticidas químéricas da presente invenção em pragas de inseto alvo.

[00162] Uma quantidade eficaz como pesticida de um agente tóxico, quando fornecida na dieta de uma praga-alvo, exibe atividade pesticida quando o tóxico entra em contato com a praga. Um agente tóxico pode ser uma proteína inseticida ou um ou mais agentes químicos conhecidos na técnica. Os agentes químicos inseticidas e os agentes proteicos inseticidas podem ser usados sozinhos ou em combinações uns com os outros. Os agentes químicos incluem, sem limitação, moléculas de dsRNA direcionadas a genes específicos para a supressão de uma praga-alvo, organocloreto, organofosfatos, carbamatos, piretroides, neonicotinoides e rianoides. Agentes de proteínas inseticidas incluem as proteínas inseticidas químéricas apresentadas neste pedido, bem como outros agentes tóxicos proteicos incluindo aqueles que visam espécies de praga de lepidópteros, assim como toxinas proteicas que são usadas para controlar outras pragas de plantas, tais como proteínas Cry disponíveis na técnica para uso no controle de espécies de espécies

de Coleópteros, Tisanópteros, Hemípteros e Homópteros.

[00163] É direcionado que a referência a uma praga, particularmente, uma praga de uma plantação, signifique pragas de insetos de plantações, particularmente, pragas de insetos Lepidópteros, que são controladas pelas proteínas inseticidas químéricas divulgadas. No entanto, a referência a uma praga pode também incluir pragas de insetos Coleópteros, hemípteros e Homópteros de plantas, bem como os nemátodos e fungos, quando os agentes tóxicos que visam estas pragas são co-localizados ou estão presentes em conjunto com a proteína inseticida químérica ou com uma proteína que é 65 a cerca de 100 por cento idêntica à proteína inseticida químérica.

[00164] As proteínas inseticidas químéricas descritas no presente documento exibem atividade inseticida no sentido de pragas de inseto a partir de espécies de insetos Lepidópteros, incluindo adultos, pupas, larvas e recém-nascidos, bem como espécies de insetos Hemípteros, incluindo adultos e ninfas. Os insetos da ordem Lepidoptera incluem, porém, sem limitação, lagartas-militar, brocas, verme e heliothines na família Noctuidae, por exemplo, lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), lagarta-da-beterraba (*Spodoptera exigua*), lagarta-bertha (*Mamestra configurata*), lagarta-negra (*Agrotis ipsilon*), lagarta-da-couve (*Trichoplusia ni*), lagarta-da-soja (*Pseudoplusia includens*), lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*), percevejo-verde (*Hypena scabra*), lagarta-do-tabaco (*Heliothis virescens*), lagarta-rosca subterrânea (*Agrotis subterranea*), lagarta-dos-cereais (*Pseudaletia unipuncta*), lagarta-rosca ocidental (*Agrotis orthogonia*); brocas, traças-da-parede, vermes-de-teia, traças-das-caníferas, traças-do-repolho e traças esqueletizadoras da família Pyralidae, por exemplo, broca-do-milho europeira (*Ostrinia nubilalis*), lagarta-laranja (*Amyelois transitella*), lagarta-da-raiz-do-milho (*Crambus caliginosellus*), verme-da-teia-dos-gramados (*Herpetogramma licarsisalis*), traça-do-girassol

(*Homoeosoma electellum*), lagarta-elasmo (*Elasmopalpus lignosellus*); lagarta-enroladeira, lagarta-da-maçã-do-algodoeiro, traça-da-semente e traça-dos-frutos na família Tortricidae, por exemplo, mariposa-das-maçãs (*Cydia pomonella*), traça-da-uva (*Endopiza viteana*), traça oriental (*Grapholita molesta*), traça-do-botão-do-girassol (*Suleima helianthana*); e muitos outros Lepidópteros economicamente importantes, por exemplo, traça-da-couve (*Plutella xylostella*), lagarta-rosada (*Pectinophora gossypiella*) e mariposa-cigano (*Lymantria dispar*). Outras pragas de insetos da ordem Lepidoptera incluem, por exemplo, *Alabama argillacea* (lagarta-da-folha-do-algodoeiro), *Archips argyrospila* (lagarta-das-folhas-das-árvores-frutíferas), *Archips rosana* (tortrídeo-dos-arbustos) e outras espécies de *Archips*, *Chilo suppressalis* (broca-do-arroz-asiático ou broca-do-colmo-do-arroz), *Cnaphalocrocis medinalis* (enrolador-da-folha), *Crambus caliginosellus* (verme-de-teia-da-raiz-do-milho), *Crambus teterrellus* (verme-de-teia-de-capim-do-campo), *Diatraea grandiosella* (broca-grande-do-milho), *Diatraea saccharalis* (broca-grande-da-cana-de-açúcar), *Earias insulana* (lagarta-espinhosa), *Earias vittella* (lagarta-da-maçã), *Helicoverpa armigera* (lagarta helicoverpa), *Helicoverpa zea* (lagarta-do-milho ou lagarta-do-algodão), *Heliothis virescens* (lagarta-do-tabaco), *Herpetogramma licarsialis* (verme-da-teia-dos-gramados), *Lobesia botrana* (traça-da-uva), *Phyllocnistis citrella* (lagarta-mineira), *Pieris brassicae* (borboleta-branca-da-couve), *Pieris rapae* (borboleta-pequena-da-couve), *Plutella xylostella* (traça-da-couve), *Spodoptera exigua* (lagarta-da-beterraba), *Spodoptera litura* (curuquerê-oriental) e *Tuta absoluta* (traça-do-tomateiro).

[00165] Referência neste pedido a uma "molécula de DNA isolada", ou um termo ou frase equivalente, destina-se a significar que a molécula de DNA é uma que esteja presente sozinha ou em combinação com outras composições, mas não dentro do seu ambiente natural. Por

exemplo, elementos de ácidos nucleicos, tais como uma sequência de codificação, sequência de ítron, sequência principal não traduzida, sequência do promotor, sequência de terminação da transcrição, e semelhantes, que são encontradas naturalmente no DNA do genoma de um organismo não são considerados como "isolado" desde que o elemento está dentro do genoma do organismo e no local dentro do genoma em que se encontra naturalmente. No entanto, cada um destes elementos, e subpartes destes elementos, seriam "isolado", no escopo da presente divulgação, desde que o elemento não esteja dentro do genoma do organismo e no local dentro do genoma em que se encontra naturalmente. De modo similar, uma sequência de nucleotídeo que codifica uma proteína inseticida ou qualquer variante inseticida de ocorrência natural dessa proteína seria uma sequência de nucleotídeos solada, desde que a sequência de nucleotídeos não esteja dentro do DNA da bactéria da qual a sequência que codifica a proteína é naturalmente encontrada. Uma sequência de nucleotídeos sintéticos que codifica a sequência de aminoácidos da proteína inseticida de ocorrência natural seria considerada isolada para os propósitos desta divulgação. Para os fins da presente divulgação, qualquer sequência de nucleotídeos transgênicos, por exemplo., a sequência de nucleotídeos do DNA inserida no genoma das células de uma planta ou bactéria, ou presente num vetor extra-cromossômico seria considerada ser uma sequência de nucleotídeos isolada se estiver presente no interior do plasmídeo ou estrutura semelhante utilizada para transformar as células, dentro do genoma da planta ou bactéria, ou presente em quantidades detectáveis em tecidos, descendência, as amostras biológicas ou produtos de bens de consumo derivados da planta ou bactéria.

[00166] Conforme descrito ainda NOs Exemplos, por meio de um esforço de quimerogênese cerca de oitocentas e quarenta e quatro

(844) sequências de nucleotídeos que codificam proteínas inseticidas químéricas foram construídas a partir dos domínios de protoxina e toxina de toxinas inseticidas conhecidas (chamadas no presente documento de "proteínas parentais"), e expressos e testados no bioensaio quanto a atividade de Lepidópteros. Um pequeno número das proteínas químéricas construídas insecticidas exibiu atividade aprimorada de Lepidópteros ou um espectro de Lepidópteros melhorado em comparação às proteínas de progenitores das quais seus componentes de toxina foram derivados.

[00167] Estas proteínas inseticidas químéricas com atividade de Lepidópteros aprimorada ou um espectro de Lepidópteros melhorado foram construídos a partir dos seguintes domínios de protoxina e toxina de proteína parental inseticida: Cry1Ah (Domínio I), Cry1Bb1 (Domínios I e II), Cry1Be2 (Domínios I e II), Cry1Ja1 (Domínios I e II), Cry1Fa1 (Domínios I e II), Cry1Ac (Domínio II e protoxina), Cry1Ca (Domínio III e protoxina), Cry1Ka (Domínio III e protoxina), Cry1Jx (Domínio III), Cry1Ab (Domínio III), Cry1Ab3 (protoxina), Cry1Da1 (protoxina), Cry4 (protoxina), Cry9 (protoxina), Cry1Be (protoxina) e Cry1Ka (protoxina).

[00168] Especificamente, as novas proteínas químéricas inseticidas da presente invenção com atividade de Lepidópteros aprimorada ou um espectro de Lepidópteros melhorado compreendem as seguintes combinações de domínio e protoxina: TIC1100/SEQ ID NO: 4 (Domínio I-Cry1Ah, Domínio II-Cry1Ac, Domínio III-Cry1Ca, Protoxina-Cry1Ac), TIC860/SEQ ID NO: 7 (Domínio I-Cry1Bb1, Domínio II-Cry1BB1, Domínio III-Cry1Ca, Protoxina-Cry1Ac), TIC867/SEQ ID NO: 10 (Domínio I-Cry1Be2, Domínio II-Cry1Be2, Domínio III-Cry1Ka, Protoxina-Cry1Ab3), TIC868/SEQ ID NO: 28 (Domínio I-Cry1Be2, Domínio II-Cry1Be2 e Domínio III-Cry1Ca, Protoxina-Cry1Ab3), TIC869/SEQ ID NO: 50 (Domínio I-Cry1Ja1, Domínio II-Cry1Ja1, Domínio III-Cry1Jx, Protoxina-Cry1Ab3) e TIC836/SEQ ID NO: 53

(Domínio I-Cry1Fa1, Domínio II-Cry1Fa1, Domínio III-Cry1Ab, Protoxina-Cry1Ac).

[00169] As variantes nas quais substituições de aminoácidos ou domínios de protoxina alternativos foram introduzidos, também foram construídas para as proteínas inseticidas quiméricas TIC867 e TIC868. Especificamente, essas variantes de TIC867 e TIC868 compreendem as seguintes substituições de aminoácidos ou domínios de protoxina alternativos: TIC867\_20/SEQ ID NO: 13 (domínio de protoxina alternativo Cry1Da1), TIC867\_21/SEQ ID NO: 16 (domínio de protoxina alternativo Cry4), TIC867\_22/SEQ ID NO: 19 (domínio de protoxina alternativo Cry9), TIC867\_23/SEQ ID NO: 21 (domínio de protoxina alternativo Cry1Be), TIC867\_24/SEQ ID NO: 23 (domínio de protoxina alternativo Cry1Ka), TIC867\_25/SEQ ID NO: 25 (domínio de protoxina alternativo Cry1Ka), TIC868\_9/SEQ ID NO: 30 (modificação de aminoácido N240S\_Y343Q\_N349T), TIC868\_10/SEQ ID NO: 33 (domínio de protoxina alternativo Cry1Da1), TIC868\_11/SEQ ID NO: 36 (domínio de protoxina alternativo Cry4), TIC868\_12/SEQ ID NO: 39 (domínio de protoxina alternativo Cry9), TIC868\_13/SEQ ID NO: 41 (domínio de protoxina alternativo Cry1Be), TIC868\_14/SEQ ID NO: 43 (domínio de protoxina alternativo Cry1Ka), TIC868\_15/SEQ ID NO: 45 (domínio de protoxina alternativo Cry1Ca), e TIC868\_29/SEQ ID NO: 47 (modificação de aminoácidos Q136Y\_Y343Q\_N349T).

[00170] Conforme demonstrado NOs Exemplos, cada uma dentre estas variantes de TIC867 e TIC868 alterou a atividade de Lepidópteros e/ou reduziu o espectro de atividade de Lepidópteros da proteína inseticida químérica parental, desta forma, indicando que o domínio de protoxina alternativo e as substituições de aminoácidos possuíam uma consequência direta sobre o espectro de atividade inseticida e proteínas insecticidas químéricas de TIC867 e TIC868.

[00171] Muitas das proteínas inseticidas químéricas demonstram

atividade inseticida contra múltiplas espécies de pragas de insetos Lepidópteros. Especificamente, as proteínas insecticidas quiméricas inovadoras divulgadas nesta aplicação exibiram atividade contra uma ou mais das seguintes pragas de insetos lepidópteros, a lagarta de soja (VBC, *Anticarsia gemmatalis*), broca de cana-de-açúcar (SCB, *Diatraea saccharalis*), lagarta-elasmo (LSCB, *Elasmopalpus lignosellus*), lagarta helicoverpa (CEW, *Helicoverpa zea*), verme da semente de soja (SPW, *Helicoverpa zea*), lagarta do algodão (CBW, *Helicoverpa zea*), lagarta do tabaco (TBW, *Heliothis virescens*), larva da soja (SBL, *Chrysodeixis includens*), lagarta da vagem (BLAW, *Spodoptera cosmioides*), Southern armyworm (SAW, *Spodoptera eridania*), lagarta-do-cartucho (FAW, *Spodoptera frugiperda*), lagarta-da-beterraba (BAW, *Spodoptera exigua*), lagarta helicoverpa (OBW, *Helicoverpa armigera*), curuquerê-oriental (OLW, *Spodoptera litura*), lagarta rosada (PBW, *Pectinophora gossypiella*), broca-do-milho-do-sudoeste (SWCB, *Diatraea grandiosella*), lagarta-pintada (SBW, *Earias vitella*), larva de vagem (SABW, *Helicoverpa gelotopeon*), e lagarta de girassol (SFL, *Rachiplusia nu*). Desta forma, as proteínas exemplificativas descritas neste pedido estão relacionadas pela função comum e exibem atividade inseticida no sentido de pragas de insetos a partir de espécies de insetos Lepidópteros, incluindo adultos, larvas e pupas.

[00172] As proteínas que se assemelham a proteínas insecticidas quiméricas podem ser identificadas por comparação umas com as outras usando vários algoritmos com base em computadores conhecidos na técnica. Por exemplo, as identidades de sequências de aminoácidos das proteínas relacionadas às proteínas insecticidas quiméricas podem ser analisadas usando um alinhamento Clustal W usando estes parâmetros padrão: matriz de peso: blosum, penalidade de abertura de lacuna: 10,0, penalidade de extensão de lacuna: 0,05, lacunas hidrofílicas: Ligado, resíduos hidrofílicos: GPSNDQERK,

Penalidades de lacuna de resíduo específico: Ligado (Thompson, *Et al* (1994) Nucleic Acids Research, 22: 4.673 a 4.680). A porcentagem de identidade de aminoácido é ainda calculada pelo produto de 100% multiplicado por (identidades de aminoácido/comprimento da proteína em questão). Outros algoritmos de alinhamento também estão disponíveis na técnica, fornecem resultados semelhantes àqueles obtidos usando um alinhamento Clustal W e são contemplados nesse pedido.

[00173] Se deseja que uma proteína de consulta que exibe atividade inibidora de insetos seja descrita neste pedido, se o alinhamento de tal proteína de consulta com as proteínas inseticidas químéricas estabelecidas em SEQ ID NOs: 4, 7, 10, 13, 16, 19, 21, 23, 25, 28, 30, 33, 36, 39, 41, 43, 45, 47, 50, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 e 111e resulta em pelo menos cerca de 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou cerca de 100% de identidade de sequência de aminoácidos (ou qualquer percentagem de fração nesta faixa) entre a proteína de consulta e matéria.

[00174] Como descrito adicionalmente NOs exemplos deste pedido, sequências sintéticas ou artificiais que codificam as proteínas inseticidas químéricas foram projetadas para uso em plantas. As sequências de nucleotídeos sintéticos exemplificativas que foram projetadas para o uso em plantas estabelecidas nas SEQ ID NOs: 2 e 3 (TIC1100), SEQ ID NO: 6 (TIC860), SEQ ID NO: 9 (TIC867), SEQ ID NO: 12 (TIC867\_20), SEQ ID NO: 15 (TIC867\_21), SEQ ID NO: 18 (TIC867\_22), SEQ ID NO: 20 (TIC867\_23), SEQ ID NO: 22 (TIC867\_24), SEQ ID NO: 24 (TIC867\_25), SEQ ID NO: 27 (TIC868), SEQ ID NO: 29 (TIC868\_9), SEQ ID NO: 32 (TIC868\_10), SEQ ID NO:

35 (TIC868\_11), SEQ ID NO: 38 (TIC868\_12), SEQ ID NO: 40 (TIC868\_13), SEQ ID NO: 42 (TIC868\_14), SEQ ID NO: 44 (TIC868\_15), SEQ ID NO: 46 (TIC868\_29), SEQ ID NO: 49 (TIC869) e SEQ ID NO: 52 (TIC836), SEQ ID NO: 112 e 113 (TIC713), SEQ ID NO: 114 (TIC843), SEQ ID NO: 115 (TIC862), SEQ ID NO: 116 (TIC1099), SEQ ID NO: 117 (TIC1103), SEQ ID NO: 118 (TIC845), SEQ ID NO: 119 (TIC846), SEQ ID NO: 120 (TIC858), SEQ ID NO: 121 (TIC866), SEQ ID NO: 122 (TIC838), SEQ ID NO: 123 (TIC841), SEQ ID NO: 124 (TIC842), SEQ ID NO: 125 (TIC850), SEQ ID NO: 126 (TIC859), SEQ ID NO: 127 (TIC861), SEQ ID NO: 128 (TIC848), SEQ ID NO: 129 (TIC849), e SEQ ID NO: 130 (TIC847)..

[00175] Para expressão em células vegetais, as proteínas inseticidas químéricas podem ser expressas para residir no citosol ou direcionadas para várias organelos da célula vegetal. Por exemplo, destinar uma proteína para o cloroplasto pode resultar em aumento dos níveis de proteína expressos numa planta transgênica, evitando fenótipos diferentes ocorram. O direcionamento também pode resultar num aumento da eficácia de resistência a pragas em caso transgênico. Um péptido alvo ou peptídeo de trânsito é uma cadeia de peptídeo curta (3 a 70 aminoácidos de comprimento) que direciona o transporte de uma proteína para uma região específica da célula, incluindo o núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático (ER), cloroplastos, apoplasto, peroxissoma e membrana plasmática. Alguns peptídeos alvo são clivados da proteína por peptidase de sinal depois de as proteínas serem transportadas. Para o direcionamento para o cloroplasto, as proteínas contêm peptídeos de trânsito que têm cerca de 40 a 50 aminoácidos. Para descrições do uso de peptídeos de trânsito de cloroplasto, *consultar* Patentes nº U.S.5.188.642 e nº U.S.5.728.925. Muitas proteínas localizadas em cloroplasto são expressas a partir de genes nucleares como precursores e são direcionadas para o

cloroplasto por um peptídeo de trânsito do cloroplasto (CTP). Exemplos de tais proteínas de cloroplastos isolados incluem, porém, sem limitação, aqueles associados com a subunidade pequena (SSU) da ribulose-1,5, carboxilase-bisfosfato, ferredoxina, ferredoxina oxidorredutase, o complexo proteína de colheita I e proteína II, tioredoxina F, enolpiruvil chiquimato fosfato sintase (EPSPS) e peptídeos de trânsito descritos na Patente nº U.S.7.193.133. Foi demonstrado *in vivo* e *in vitro* que as proteínas não cloroplasto podem ser direcionadas ao cloroplasto pelo uso de fusões de proteínas com uma CTP heteróloga e que a CTP é suficiente para destinar uma proteína para o cloroplasto. A incorporação de um peptídeo de trânsito de cloroplasto adequado tal como o *Arabidopsis thaliana* EPSPS CTP (CTP2) (consultar, Klee *et al.*, *Mol. Gen Genet.* 210: páginas 437 a 442, 1987) ou o *Petunia hybrida* EPSPS CTP (CTP4) (consultar, Della-Cioppa *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: páginas 6.873 a 6.877, 1986) foi mostrada direcionando sequências protéicas de EPSPS heterólogas para cloroplastos em plantas transgênicas (consultar, Patentes nº U.S.5.627.061; nº U.S.5.633.435; e nº U.S.5.312.910; e nº EP0218571; nº EP189707; nº EP508909; e EP924299). Para destinar as proteínas inseticidas quiméricas para o cloroplasto, uma sequência que codifica um peptídeo de trânsito de cloroplasto é colocada em 5' em ligação operável e na estrutura com uma sequência de codificação sintética que codifica a proteína inseticida químérica que foi projetada para expressão ideal em células vegetais.

[00176] Os cassetes de expressão e os vetores contendo estas sequências de nucleotídeos sintéticos ou artificiais foram construídos e introduzidos em células de plantas de milho, algodão e soja de acordo com os métodos e conjuntos de procedimentos de transformação que são conhecidos na técnica. As células transformadas foram regeneradas em plantas transformadas que foram observadas

expressando a proteína inseticida quimérica. Para testar a atividade pesticida, foram realizados bioensaios na presença de larvas de praga de lepidópteros usando discos de folhas de plantas obtidos junto às plantas transformadas. As composições de moléculas de ácidos nucleicos recombinantes que codificam as proteínas inseticidas quiméricas são contempladas. Por exemplo, as proteínas inseticidas quiméricas podem ser expressas com construtos de DNA recombinante, em que uma molécula de polinucleotídeo com uma ORF que codifica a proteína inseticida quimérica operacionalmente ligada a elementos de expressão genética tal como um promotor e qualquer outro elemento regulador necessário para a expressão no sistema para o qual se destina o construto. Exemplos não limitadores incluem um promotor de planta funcional operacionalmente ligado à proteína inseticida quimérica sintética que codifica sequências para a expressão da proteína inseticida quimérica em plantas ou um promotor de *Bt* funcional operacionalmente ligado a uma proteína inseticida quimérica que codifica a sequência para a expressão da proteína numa bactéria *Bt* ou outras espécies de *Bacillus*. Outros elementos podem ser operacionalmente ligados às proteínas inseticidas quiméricas que codificam sequências incluindo, sem limitação, intensificadores, ítrons, líderes não traduzidos, etiquetas de imobilização de proteína codificada (HIS-tag), peptídeos de translocação (*isto é*, peptídeos de trânsito de plastídeo, peptídeos de sinal), sequências de polipeptídeo para enzimas de modificação pós-translacional, sítios de ligação ribissômicos e sítios-alvo de RNAi.

[00177] Moléculas de polinucleotídeo recombinante exemplificativas aqui fornecidas incluem, sem limitação, um promotor heterólogo operacionalmente ligado a um polinucleotídeo tal como SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 27, 29, 31, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 49, 51, 52 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66,

68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129 e 130; que codifica o polipeptídeo ou proteína tendo a sequência de aminoácidos conforme apresentado na SEQ ID NOs: 4 (TIC1100), 7 (TIC860), 10 (TIC867), 13 (TIC867\_20), 16 (TIC867\_21), 19 (TIC867\_22), 21 (TIC867\_23), 23 (TIC867\_24), 25 (TIC867\_25), 28 (TIC868), 30 (TIC868\_9), 33 (TIC868\_10), 36 (TIC868\_11), 39 (TIC867\_12), 41 (TIC867\_13), 43 (TIC867\_14), 45 (TIC867\_15), 47 (TIC867\_29), 50 (TIC869), 53 (TIC836), 55 (TIC713), 57 (TIC843), 59 (TIC862), 61 (TIC1099), 63 (TIC1099-T507E), 65 (TIC1099-R522K), 67 (TIC1099-K490S), 69 (TIC1099-T562R), 71 (TIC1099-S533R), 73 (TIC1099-G498D), 75 (TIC1099-K490A), 77 (TIC1099-E564A), 79 (TIC1103), 81 (TIC1101), 83 (TIC845), 85 (TIC846), 87 (TIC858), 89 (TIC865), 91 (TIC866), 93 (TIC838), 95 (TIC839), 97 (TIC841), 99 (TIC842), 101 (TIC850), 103 (TIC859), 105 (TIC861), 107 (TIC848), 109 (TIC849), e 111 (TIC847). Um promotor heterólogo também pode ser operacionalmente ligado a sequências codificantes de DNA sintético que codificam uma proteína inseticida químérica alvo de plástideo e proteína inseticida químérica não alvo. Contempla-se que os códons de uma molécula de ácidos nucleicos recombinantes que codifica uma proteína inseticida químérica divulgada neste documento pode ser substituída por códons sinônimos (conhecidos na técnica como uma substituição silenciosa).

[00178] Uma molécula de DNA recombinante ou construto que compreende uma proteína inseticida químérica que codifica sequência pode compreender adicionalmente uma região de DNA que codifica um ou mais agentes tóxicos que podem ser configurados para expressar concomitantemente ou coexpressar uma sequência de DNA que codifica uma proteína inseticida químérica, uma proteína diferente de uma proteína inseticida químérica, uma molécula de dsRNA inibidora de

insetos ou uma proteína complementar. Proteínas complementares incluem, sem limitação, cofatores, enzimas, parceiros de ligação ou outros agentes que funcionam para ajudar na eficácia de um agente inibidor de insetos, por exemplo, para ajudar em sua expressão, influenciando sua estabilidade em plantas, otimizando energia livre para oligomerização, aumentando sua toxicidade e aumentando seu espectro de atividade. Uma proteína complementar pode facilitar a absorção de um ou mais agentes inibidores de insetos, por exemplo, ou potencializar os efeitos tóxicos do agente tóxico.

[00179] Uma molécula de DNA recombinante ou construto pode ser montado de modo que todas as proteínas ou moléculas de dsRNA sejam expressas de um promotor ou cada proteína ou molécula de dsRNA está sob o controle de promotor separado ou alguma combinação dos mesmos. As proteínas desta invenção podem ser expressas de um sistema de expressão de múltiplos genes em que uma proteína inseticida quimérica é expressa de um segmento de nucleotídeos comuns, que também contém outros quadros de leitura aberta e promotores, dependendo do tipo de sistema de expressão selecionado. Por exemplo, um sistema de expressão de múltiplos genes bacterianos pode utilizar um único promotor para acionar a expressão de quadros de leitura aberta ligados de múltiplas formas/aleatórios dentro de um único operon (*isto é*, a expressão policistrônica). Em outro exemplo, um sistema de expressão de múltiplos genes de plantas pode utilizar cassetes de expressão não ligados de maneira múltipla, cada um expressando uma proteína diferente ou outro agente tóxico, tal como uma ou mais moléculas de dsRNA.

[00180] As moléculas de ácido nucleico recombinantes ou os construtos de DNA recombinante compreendendo uma sequência que codificação proteína inseticida quimérica pode ser administrada a

células hospedeiras por vetores, por exemplo, plasmídeo, baculovírus, cromossoma sintético, vírion, cosmídeo, fagomídeo, fago ou vetor viral. Tais vetores podem ser usados para alcançar a expressão estável ou transitória de uma sequência codificadora de proteína inseticida quimérica numa célula hospedeira, ou expressão subsequente do polipeptídeo codificado. Um polinucleotídeo recombinante exógeno ou construto de DNA recombinante que compreende uma sequência de codificação de sequência proteica inseticida quimérica e que é introduzido numa célula hospedeira também é referido, neste documento, como um "transgene".

[00181] Bactérias transgênicas, células vegetais transgênicas, plantas transgênicas e partes de plantas transgênicas que contêm um polinucleotídeo que codifica qualquer uma ou mais das proteínas insecticidas químéricas são fornecidas neste documento. O termo "célula bacteriana" ou "bactéria" pode incluir, sem limitação, uma célula de *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas* ou *Rhizobium*. O termo "célula vegetal" ou "planta" pode incluir, sem limitação, uma célula dicotiledônea ou uma célula monocotiledônea. Plantas e células vegetais contempladas incluem, sem limitação, alface, banana, cevada, feijão, brócolos, couve, brassica, cenoura, mandioca, mamona, couve-flor, aipo, grão-de-bico, couve chinesa, cítrico, coco, café, milho, trevo, algodão, abóbora, pepino, abeto-de-Douglas, berinjela, eucalipto, linho, alho, uva, lúpulo, alho-poró, alface, *Pinus taeda*, painço, melões, noz, aveia, azeite, cebola, ornamental, palma, capim, ervilha, amendoim, pimenta, ervilha-da-Angola, pinho, batata, álamo, abóbora, pinheiro radiata, rabanete, colza, arroz, porta-enxertos, centeio, cártamo, arbusto, sorgo, pinho sul, soja, espinafre, abóbora, morango, beterraba sacarina, cana, girassol, milho doce, goma doce, batata-doce, gramínea-do-norte, chá, tabaco, tomate, triticale, relvado, melancia e célula vegetal ou planta de trigo. Em certas modalidades, as

plantas transgênicas e partes de plantas transgênicas regeneradas de uma célula vegetal transgênica são fornecidas. Em certas modalidades, as plantas transgênicas podem ser obtidas a partir de uma semente transgênica, por corte, rotura, moagem ou dissociação de outra forma a parte da planta. Em certas modalidades, a parte da planta pode ser uma semente, uma cápsula, uma folha, uma flor, um caule, uma raiz, ou qualquer porção da mesma, ou uma porção não regenerável, de uma parte da planta transgênica. Conforme usado neste contexto, uma porção "não regenerável" de uma parte de planta transgênica é uma porção que não pode ser induzida a formar uma planta inteira ou que não pode ser induzida a formar uma planta inteira capaz de reprodução sexual ou assexual. Em certas modalidades, uma porção não regenerável de uma parte de planta é uma porção de um uma semente, de um casulo, de uma folha, flor, de um caule ou de uma raiz transgênica.

[00182] Métodos de fabricação de plantas transgênicas que compreendem quantidades inibidoras de lepidópteros de proteínas inseticidas químéricas são fornecidas. Tais plantas podem ser produzidas através da introdução de um polinucleotídeo que codifica as proteínas inseticidas químéricas fornecidas neste pedido numa célula vegetal, e da seleção de uma planta derivada da referida célula vegetal que expressa uma quantidade inibidora de inseto ou lepidópteros da proteína inseticida químérica. Plantas podem ser derivadas a partir de células de plantas por regeneração, sementes, pólen ou técnicas de transformação de meristema. Os métodos para a transformação de plantas são conhecidos na técnica. Por exemplo, a transformação mediada por *Agrobacterium* é descrita nas Publicações de Pedido de Patente nº U.S.2009/0138985A1 (soja), U.S.2008/0280361A1 (soja), U.S.2009/0142837A1 (milho), U.S.2008/0282432 (algodão) e U.S.2008/0256667 (algodão).

[00183] As plantas que expressam as proteínas inseticidas químéricas podem ser cruzadas por meio da reprodução com eventos transgênicos expressando outras proteínas inseticidas e/ou expressando outros traços transgênicos tais como outros traços de controle de insetos, genes de tolerância a herbicidas, genes que conferem características de rendimento ou tolerância ao estresse e similares, ou tais traços podem ser combinados num único vetor para que os traços sejam todos ligados.

[00184] Os produtos vegetais processados, em que o produto processado compreende uma quantidade detectável de uma proteína inseticida químérica, um segmento inibidor de insetos ou um fragmento da mesma, ou qualquer porção distintiva da mesma, são também revelados neste pedido. Em certas modalidades, o produto processado é selecionado do grupo que consiste em partes de planta, biomassa vegetal, óleo, farinha, açúcar, alimentos para animais, farinhas de farelo, flocos, fiapos, cascas, sementes processadas e sementes. Em certas modalidades, o produto processado é não regenerável. O produto vegetal pode compreender mercadorias ou outros produtos de bens de consumo derivados de uma planta transgênica ou de uma parte de planta transgênica, em que o produto de bens de consumo ou outros produtos podem ser rastreados através do comércio através da detecção de segmentos de nucleotídeos ou RNA ou proteínas expressas que codificam ou compreendem porções distintivas de uma proteína inseticida químérica.

[00185] Os métodos de controle de insetos, em particular, infestações de lepidópteros de plantações, com as proteínas inseticidas químéricas são também reveladas neste pedido. Tais métodos podem compreender o cultivo de uma planta compreendendo uma quantidade inibidora de lepidópteros ou inseto da proteína inseticida químérica. Em certas modalidades, tais métodos podem ainda compreender qualquer

um ou mais dentre: (i) aplicar qualquer composição compreendendo ou codificando uma proteína inseticida quimérica a uma planta ou uma semente que dê origem a uma planta; e (ii) transformar uma planta ou uma célula vegetal que dá origem a uma planta com um polinucleotídeo que codifica uma proteína inseticida quimérica. Em geral, é contemplado que a proteína inseticida quimérica pode ser fornecida numa composição, fornecida num micro-organismo ou fornecida numa planta transgênica para conferir atividade inibidora de insetos contra insetos lepidópteros.

[00186] Em certas modalidades, a proteína inseticida quimérica é o ingrediente ativo como inseticida de uma composição inibidora de inseto preparada por cultivo de *Bacilo* recombinante ou qualquer outra célula bacteriana recombinante transformada para expressar uma proteína inseticida quimérica sob condições adequadas para a expressão. Tal composição pode ser preparada por dessecção, liofilização, homogeneização, extração, filtração, centrifugação, sedimentação ou concentração de uma cultura de tais células recombinantes que expressam/produzem a proteína inseticida quimérica. Tal processo pode resultar num extrato de célula de *Bacilo* ou outro extrao de célula bacteriana entomopatogênica, suspensão celular, homogenato celular, lisado celular, sobrenadante celular, filtrado celular ou sedimento celular. Através da obtenção da proteína inseticida quimérica tal como produzida, uma composição que inclui a proteína inseticida quimérica pode incluir células bacterianas, esporos bacterianos e corpos de inclusão paraspórais e pode ser formulada para várias utilizações, incluindo como produtos de pulverização inibidores de insetos agrícolas ou como formulações inibidoras de insetos em bioensaios dietéticos.

[00187] O composto ou formulação mencionada acima pode compreender ainda um carreador aceitável em agricultura, tal como uma isca, um pó, poeira, pélete, grânulo, pulverização, emulsão, uma

suspensão coloidal, uma solução aquosa, uma preparação de esporo ou cristal de *Bacilo* ou um tratamento de sementes. O composto ou formulação também pode compreender ainda uma célula vegetal recombinante, tecido vegetal, sementes ou planta transformada para expressar uma ou mais das proteínas; ou bactéria transformada para expressar uma ou mais das proteínas. Dependendo do nível de inibição inseticida ou inibição de insetos inerente ao polipeptídeo recombinante e do nível de composto ou formulação a ser aplicada a uma planta ou ensaio de dieta, o composto ou formulação pode incluir várias quantidades em peso do polipeptídeo recombinante, por exemplo de 0,0001% a 0,001% a 0,01% a 1% a 99% em peso do polipeptídeo recombinante.

[00188] Numa modalidade, a fim de reduzir a probabilidade de desenvolvimento de resistência, uma composição inibidora de inseto ou planta transgênica compreendendo uma proteína inseticida quimérica pode compreender ainda pelo menos um agente tóxico adicional que exibe atividade inibidora de inseto contra a mesma espécie de inseto Lepidóptero, mas que é diferente da proteína inseticida quimérica. Possíveis agentes tóxicos adicionais para tal composição incluem uma proteína inibidora de insetos e uma molécula de dsRNA inibidora de inseto. Um exemplo para uso de tais sequências de ribonucleotídeos para controlar as pragas de insetos é descrito em Baum, *Et al.* (Publicação de Patente US 2006/0021087 A1). Tal polipeptídeo adicional (ou polipeptídeos) para o controle de pragas de lepidópteros pode ser selecionado do grupo que consiste numa proteína inibidora de insetos, tais como, sem limitação, Cry1A (Patente nº US 5.880.275), Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B (Pedido de Patente nº U.S.10/525,318), Cry1C (Pedido de Patente nº U.S.6.033.874), quimeras Cry1D, Cry1E, Cry1F e Cry1A/F (Pedido de Patente nº U.S.7.070.982; nº U.S.6.962.705; e nº U.S.6.713.063), Cry1G, Cry1H,

Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, Cry2A, Cry2Ab (Pedido de Patente nº U.S.7.064.249), Cry2Ae, Cry4B, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry15, Cry43A, Cry43B, Cry51Aa1, ET66, TIC400, TIC800, TIC834, TIC1415, Vip3A, VIP3Ab, VIP3B, AXMI-001, AXMI-002, AXMI-030, AXMI-035, E AXMI-045 (Pedido de Patente nº U.S.2013-0117884 A1), AXMI-52, AXMI-58, AXMI-88, AXMI-97, AXMI-102, AXMI-112, AXMI-117, AXMI-100 (Pedido de Patente nº U.S.2013-0310543 A1), AXMI-115, AXMI-113, AXMI-005 (Pedido de Patente nº U.S.2013-0104259 A1), AXMI-134 (Pedido de Patente nº U.S.2013-0167264 A1), AXMI-150 (Pedido de Patente nº U.S.2010-0160231 A1), AXMI-184 (Pedido de Patente nº U.S.2010-0004176 A1), AXMI-196, AXMI-204, AXMI-207, AXMI-209 (Pedido de Patente nº U.S.2011-0030096 A1), AXMI-218, AXMI-220 (Pedido de Patente nº U.S.2014-0245491 A1), AXMI-221z, AXMI-222z, AXMI-223z, AXMI-224z, AXMI-225z (Pedido de Patente nº U.S.2014-0196175 A1), AXMI-238 (Pedido de Patente nº U.S.2014-0033363 A1), AXMI-270 (Pedido de Patente nº U.S.2014-0223598 A1), AXMI-345 (Pedido de Patente nº U.S.2014-0373195 A1), DIG-3 (Pedido de Patente nº U.S.2013-0219570 A1), DIG-5 (Pedido de Patente nº U.S.2010-0317569 A1), DIG-11 (Pedido de Patente nº U.S.2010-0319093 A1), AfIP-1A e derivados dos mesmos (Pedido de Patente nº U.S.2014-0033361 A1), AfIP-1B e derivados dos mesmos (Pedido de Patente nº U.S.2014-0033361 A1), PIP-1APIP-1B (Pedido de Patente nº U.S.2014-0007292 A1), PSEEN3174 (Pedido de Patente nº U.S.2014-0007292 A1), AECFG-592740 (Pedido de Patente nº U.S.2014-0007292 A1), Pput\_1063 (Pedido de Patente nº U.S.2014-0007292 A1), Pput\_1064 (Pedido de Patente nº U.S.2014-0007292 A1), GS-135 e derivados dos mesmos (Pedido de Patente nº U.S.2012-0233726 A1), GS153 e derivados dos mesmos (Pedido de Patente nº U.S.2012-0192310 A1), GS154 e derivados dos mesmos (Pedido de Patente nº U.S.2012-0192310 A1), GS155 e derivados dos mesmos

(Pedido de Patente nº U.S.2012-0192310 A1), SEQ ID NO:2 e derivados dos mesmos conforme descrito no Pedido de Patente nº U.S.2012-0167259 A1, SEQ ID NO:2 e derivados dos mesmos conforme descrito no Pedido de Patente nº U.S.2012-0047606 A1, SEQ ID NO:2 e derivados dos mesmos conforme descrito no Pedido de Patente nº U.S.2011-0154536 A1, SEQ ID NO:2 e derivados dos mesmos conforme descrito no Pedido de Patente nº U.S.2011-0112013 A1, SEQ ID NO:2 e 4 e derivados dos mesmos conforme descrito no Pedido de Patente nº U.S.2010-0192256 A1, SEQ ID NO:2 e derivados dos mesmos conforme descrito no Pedido de Patente nº U.S.2010-0077507 A1, SEQ ID NO:2 e derivados dos mesmos conforme descrito no Pedido de Patente nº U.S.2010-0077508 A1, SEQ ID NO:2 e derivados dos mesmos conforme descrito no Pedido de Patente nº U.S.2009-0313721 A1, SEQ ID NO:2 ou 4 e derivados dos mesmos conforme descrito no Pedido de Patente nº U.S.2010-0269221 A1, SEQ ID NO:2 e derivados dos mesmos conforme descrito no Pedido de Patente nº U.S.7.772.465 (B2), CF161\_0085 e derivados dos mesmos conforme descrito no documento WO2014/008054 A2, proteínas tóxicas Lepidóptera e derivados dos mesmos conforme descrito NOs Pedidos de Patente nº U.S.US2008-0172762 A1, nº US2011-0055968 A1, e nº US2012-0117690 A1; SEQ ID NO:2 e derivados dos mesmos conforme descrito no documento US7510878(B2), SEQ ID NO:2 e derivados dos mesmos conforme descrito no Pedido de Patente nº U.S.7812129(B1); e semelhantes.

[00189] Em outras modalidades, uma composição inibidora de inseto ou uma planta transgênica pode ainda compreender pelo menos um agente tóxico adicional que exiba atividade inibidora de inseto a uma praga de inseto que não é inibida pelas proteínas inseticidas químéricas da presente invenção (tais como pragas de coleópteros, hemípteros e homópteros), a fim de expandir o espectro de inibição de insetos obtido.

[00190] Tal agente tóxico adicional para o controle de pragas de coleópteros pode ser selecionado do grupo consistindo numa proteína inibidora de inseto, tal como, sem limitação, Cry3Bb (Patente nº US 6.501.009), variantes Cry1C, variantes Cry3A, Cry3, Cry3B, Cry34/35, 5307, AXMI-134 (Publicação de Patente nº US 2013-0167264 A1), AXMI-184 (Publicação de Patente nº US 2010-0004176 A1), AXMI-205 (Publicação de Patente nº US 2014-0298538 A1), axmi207 (Publicação de Patente nº US 2013-0303440 A1), AXMI-218, AXMI-220 (Publicação de Patente nº US 20140245491A1), AXMI-221z, AXMI-223z (Publicação de Patente nº US 2014-0196175 A1), AXMI- 279 (Publicação de Patente nº US 2014-0223599 A1), AXMI-R1 e variantes das mesmas (Publicação de Patente nº US 2010-0197592 A1, TIC407, TIC417, TIC431, TIC807, TIC853, TIC901, TIC1201, TIC3131, DIG-10 (Publicação de Patente nº US 2010-0319092 A1), e eHIPs (Publicação de Pedido de Patente nº US 2010 / 0017914), IP3 e variantes das mesmas (Publicação de Patente nº US 2012-0210462 A1), e  $\alpha$ -Hexatoxina-Hv1a (Publicação de Pedido de Patente nº US US2014-0366227 A1).

[00191] Tal agente tóxico adicional para o controle de pragas de hemípteros pode ser selecionado do grupo que consiste em proteínas ativas para hemípteros, tais como, sem limitação, TIC1415 (Publicação Patente nº US 2013-0097735 A1), TIC807 (Patente nº US 8.609.936), TIC834 (Publicação de Patente nº US 2013-0269060 A1), AXMI-036 (Publicação da Patente nº US 2010-0137216 A1) e AXMI-171 (Publicação da Patente nº US 2013-0055469 A1). Polipeptídeos adicionais para o controle de insetos coleópteros, lepidópteros e hemípteros podem ser encontrados na página da web de nomenclatura de toxina de *Bacillus thuringiensis* mantida por Neil Crickmore (na página [btomenclature.info](http://btomenclature.info)).

[00192] As sequências codificantes de proteína inseticida químérica e as sequências que têm uma percentagem substancial de identidade

com as proteínas inseticidas quiméricas podem ser identificadas usando métodos conhecidos pelos versados na técnica tais como reação em cadeia da polimerase (PCR), amplificação térmica e hibridização. Por exemplo, as proteínas inseticidas quiméricas podem ser usadas para produzir anticorpos que se ligam especificamente a proteínas relacionadas e podem ser usadas para pesquisar e encontrar outras proteínas que estão intimamente relacionadas.

[00193] Além disso, as sequências de nucleotídeos que codificam as proteínas inseticidas quiméricas podem ser usadas como sondas e iniciadores para rastreio para identificar outros membros da classe usando métodos de hibridização e amplificação isotérmica ou de ciclo térmico. Por exemplo, podem ser usados oligonucleotídeos derivados de sequências como apresentado na SEQ ID NO: 2 para determinar a presença ou ausência de um transgene inseticida químérico numa amostra de ácido desoxirribonucleico derivada de um produto de bens de consumo. Dada a sensibilidade de certos métodos de detecção de ácido nucleico que empregam oligonucleotídeos, prevê-se que os oligonucleotídeos derivados de sequências como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NO: 2 podem ser usados para detectar a respectiva proteína inseticida químérica em produtos de bens de consumo derivados de fontes reunidas em que apenas uma fração do produto de bens de consumo é derivada de uma planta transgênica contendo qualquer uma das SEQ ID NO: 2.

## **EXEMPLOS**

[00194] Considerando o disposto acima, os versados na técnica apreciarão que as seguintes modalidades descritas são meramente representativas da invenção, que pode ser concretizada de várias formas. Assim, detalhes estruturais e funcionais específicos divulgados neste documento não devem ser interpretados como limitadores.

## **EXEMPLO 1**

## **CRIAÇÃO E CLONAGEM DE SEQUÊNCIAS CODIFICANTES DE PROTEÍNA INSETICIDA QUIMÉRICA ATIVA PARA LEPIDÓPTEROS INOVADORAS**

[00195] Este Exemplo ilustra a criação das proteínas insecicidas químéricas inovadoras e a clonagem e expressão das proteínas inseticidas químéricas.

[00196] As sequências de ácidos nucleicos recombinantes foram construídas a partir de genes de proteínas Cry conhecidos para produzir sequências de polinucleotídeos que codificam proteínas inseticidas químéricas inovadoras. As sequências polinucleotídicas resultantes foram clonadas num vetor de plasmídeo de expressão de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Após a confirmação da sequência de polinucleotídeo, o plasmídeo de expressão foi transformado em *Bt* e expressado. Preparações das proteínas químéricas inovadoras expressas foram analisadas quanto à atividade contra várias pragas de lepidópteros.

[00197] Muitas sequências de polinucleotídeos que codificam proteínas inseticidas químéricas foram produzidas e testadas no bioensaio. Nem todas as proteínas inseticidas químéricas demonstraram atividade. Apenas algumas das proteínas inseticidas químéricas foram selecionadas com base na sua atividade específica para lepidópteros demonstrada no bioensaio. Variantes de aminoácidos, em que substituições de aminoácidos, ou domínios protoxina alternativos, foram introduzidas também foram produzidas com base nas proteínas inseticidas químéricas originais TIC867 e TIC868. Os componentes das proteínas inseticidas químéricas (domínios I, II e III e da protoxina) da presente invenção são apresentados na Tabela 1. As substituições de aminoácidos nas variantes de TIC868 em relação à sequência da proteína TIC868 original também são apresentadas.

### **TABELA 1. PROTEÍNAS PESTICIDAS QUIMÉRICAS INOVADORAS E SEUS COMPONENTES.**

Toxina	SEQ ID NO DE PRT:	Dom1	Dom2	Dom3	Protox	Modificações de Aminoácido*
TIC1100	4	Cry1Ah	Cry1Ac	Cry1Ca	Cry1Ac	
TIC860	7	Cry1Bb1	Cry1Bb1	Cry1Ca	Cry1Ac	
TIC867	10	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ka	Cry1Ab3	
TIC867_20	13	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ka	Cry1Da1	
TIC867_21	16	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ka	Cry4	
TIC867_22	19	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ka	Cry9	
TIC867_23	21	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ka	Cry1Be	
TIC867_24	23	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ka	Cry1Ka	
TIC867_25	25	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ka	Cry1Ca	
TIC868	28	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ca	Cry1Ab3	
TIC868_9	30	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ca	Cry1Ab3	N240S_Y343 Q_N349T
TIC868_10	33	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ca	Cry1Da1	
TIC868_11	36	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ca	Cry4	
TIC868_12	39	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ca	Cry9	
TIC868_13	41	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ca	Cry1Be	
TIC868_14	43	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ca	Cry1Ka	
TIC868_15	45	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ca	Cry1Ca	
TIC868_29	47	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ca	Cry1Ab3	Q136Y_Y343 Q_N349T
TIC869	50	Cry1Ja1	Cry1Ja1	Cry1Jx	Cry1Ab3	
TIC836	53	Cry1Fa1	Cry1Fa1	Cry1Ab	Cry1Ac	

[00198] \* As mutações de aminoácidos são identificadas usando o código de aminoácidos padrão da IUPAC. Consultar a Comissão Conjunta IUPAC-IUB para Nomenclatura Bioquímica. Nomenclatura e Simbolismo para Aminoácidos e Peptídeos. Eur. J. Biochem. 138:9 a 37(1984). A primeira abreviatura de sequência de aminoácidos indica o aminoácido original na dada proteína-esqueleto, o número representa a

posição do aminoácido, e a segunda abreviatura de sequência de aminoácidos indica o aminoácido colocado nessa posição na proteína variante melhorada.

## **EXEMPLO 2**

[00199] As Proteínas Inseticidas Químéricas Inovadoras Demonstram Atividade Contra Pragas de Lepidópteros

[00200] Este Exemplo ilustra o teste das proteínas inseticidas químéricas descritas no Exemplo 1 e da atividade de lepidópteros observada para as proteínas inseticidas químéricas.

[00201] As sequências de polinucleotídeo que codificam proteínas inseticidas químéricas foram expressas em *Bt*. As proteínas inseticidas químéricas expressas foram, então, testadas contra uma variedade de lepidópteros conhecida por ser uma praga de milho, cana de açúcar, soja e algodão, bem como outras plantações. Especificamente, as proteínas inseticidas foram analisadas para atividade contra lagarta-da-soja (VBC, *Anticarsia gemmatalis*), broca-da-cana-de-açúcar (SCB, *Diatraea saccharalis*), lagarta-elasmo (LSCB, *Elasmopalpus lignosellus*), lagarta-do-milho (CEW, *Helicoverpa zea*), lagarta-do-tabaco (TBW, *Heliothis virescens*), lagarta-falsa-medideira (SBL, *Chrysodeixis includens*), lagarta-da-vagem (BLAW, *Spodoptera cosmioides*), lagarta-das-vagens (SAW, *Spodoptera eridania*), lagarta-militar (FAW, *Spodoptera frugiperda*), lagarta-da-beterrada (BAW, *Spodoptera exigua*), lagarta-helicoverpa (OBW, *Helicoverpa armigera*), curuquerê-oriental (OLW, *Spodoptera litura*), lagarta-rosada (PBW, *Pectinophora gossypiella*), lagarta-negra (BCW, *Agrotis ipsilon*), broca-do-milho-do-sudoeste (SWCB, *Diatraea grandiosella*), lagarta-pintada (SBW, *Earias vitella*) e broca-europeia-do-milho (ECB, *Ostrinia nubilalis*). A lagarta-do-milho (CEW, *Helicoverpa zea*) também é referida como lagarta-da-soja (SPW) e lagarta-do-algodão (CBW). A atividade foi determinada através de uma combinação de escores de mortalidade

e nanismo, bem como escores de MIC50. MIC50 se refere a uma concentração de inibição de muda em que tanto as larvas mortas como as larvas L1 (larvas que falharam na muda para o segundo instar) são consideradas no escore. A Tabela 2 mostra a atividade de cada proteína inseticida quimérica. Um sinal ‘+’ indica a atividade observada para a praga de inseto específica.

**TABELA 2. ATIVIDADE DE BIOENSAIO CONTRA LEPIDÓPTEROS SELECIONADOS.**

Toxina	SEQ ID NO DE PRT:	Inseto																	
		VBC	SCB	LSCB	CEW SPW CBW	BLAW	TBW	SBL	SAW	FAW	BAW	OBW	OLW	PBW	BCW	SWCB	ECB	SBW	
TIC1100	4	+	+			+			+		+		+	+					
TIC860	7	+	+	+		+	+	+	+	+	+		+	+		+		+	
TIC867	10	+	+			+		+		+	+	+	+			+			
TIC867_20	13																		
TIC867_21	16				+														
TIC867_22	19				+					+									
TIC868	28	+	+			+		+		+	+		+	+		+		+	
TIC868_10	33									+									
TIC868_11	36									+									
TIC868_12	39									+									
TIC869	50	+	+					+		+						+			
TIC836	53	+				+		+	+	+									

[00202] Como pode ser visto na Tabela 2 acima, a maioria das proteínas inseticidas químéricas exibiu atividade contra uma ou mais espécies de pragas lepidópteros.

### **EXEMPLO 3**

#### **SÍNTESE DE GENES QUE CODIFICAM PROTEÍNAS INSETICIDAS QUIMÉRICAS E PARA A EXPRESSÃO EM PLANTAS**

[00203] Este Exemplo ilustra a síntese de polinucleotídeos que codificam as proteínas inseticidas químéricas para expressão em plantas.

[00204] Sequências codificantes sintéticas foram construídas para uso na expressão das proteínas inseticidas químéricas em plantas. As sequências sintéticas foram projetadas e sintetizadas de acordo com os métodos geralmente descritos na Patente nº US 5.500.365, evitando certas sequências problemáticas tais como sequências de poliadenilação de plantas ricas em ATTAA e A/T enquanto preserva a sequência de aminoácidos da proteína inseticida químérica. As sequências de nucleotídeos para estes genes que codificam proteínas inseticidas químéricas para expressão em plantas estão listadas abaixo na Tabela 3.

#### **TABELA 3. SEQUÊNCIAS DE POLINUCLEOTÍDEOS QUE CODIFICAM PROTEÍNAS INSETICIDAS QUIMÉRICAS PROJETADAS PARA USO EM PLANTAS.**

Proteína Inseticida	SEQ ID NO DE DNA:	SEQ ID NO DE PRT:
TIC1100	2	4
TIC1100	3	4
TIC860	6	7
TIC867	9	10
TIC867_20	12	13

Proteína Inseticida	SEQ ID NO DE DNA:	SEQ ID NO DE PRT:
TIC867_21	15	16
TIC867_22	18	19
TIC867_23	20	21
TIC867_24	22	23
TIC867_25	24	25
TIC868	27	28
TIC868_9	29	30
TIC868_10	32	33
TIC868_11	35	36
TIC868_12	38	39
TIC868_13	40	41
TIC868_14	42	43
TIC868_15	44	45
TIC868_29	46	47
TIC869	49	50
TIC836	52	53

**EXEMPLO 4.**

**CASSETES DE EXPRESSÃO PARA A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS INSETICIDAS QUIMÉRICAS EM PLANTAS**

[00205] Este Exemplo ilustra a construção de cassetes de expressão compreendendo sequências de polinucleotídeo concebidas para uso em plantas que codificam proteínas inseticidas quiméricas.

[00206] Foi construída uma variedade de cassetes de expressão de plantas com as sequências de polinucleotídeos que codificam as proteínas inseticidas quiméricas concebidas para expressão de planta

apresentada na Tabela 3. Tais cassetes de expressão são úteis para a expressão transitória em protoplastos vegetais ou transformação de células vegetais. Os cassetes de expressão típicos foram concebidos em relação à colocação eventual da proteína dentro da célula. Um conjunto de cassetes de expressão foi concebido de forma a permitir que a proteína fosse traduzida e permanecesse no citosol. Outro conjunto de cassetes de expressão foi concebido para ter um peptídeo de trânsito contíguo com a proteína de toxina para permitir o direcionamento para uma organela da célula, tal como o cloroplasto ou plastídeo. Todos os cassetes de expressão foram concebidos para começar na extremidade 5' com um promotor, que pode ser composto de vários elementos promotores, elementos intensificadores, ou outros elementos de expressão conhecidos pelos versados na técnica operacionalmente ligados para reforçar a expressão do transgene. A sequência de promotor foi geralmente seguida contiguamente com uma ou mais sequências líder 3' relativamente para o promotor. Uma sequência de ítron foi geralmente fornecida 3' da sequência líder para melhorar a expressão do transgene. Uma sequência de codificação para a toxina ou peptídeo de trânsito e a sequência que codifica para a toxina foi normalmente localizada em 3' para a configuração do promotor, líder e ítron ligados operacionalmente. Uma sequência de 3' UTR era geralmente fornecida 3' da sequência de codificação para facilitar a terminação da transcrição e para fornecer sequências importantes para a poliadenilação do transcrito resultante. Todos os elementos acima descritos estavam operativamente ligados e dispostos sequencialmente, muitas vezes, com sequências complementares previstas na construção do cassete de expressão.

## **EXEMPLO 5**

### **ATIVIDADE DE LEPIDÓPTEROS DAS PROTEÍNAS INSETICIDAS QUIMÉRICAS EM MILHO ESTAVELMENTE TRANSFORMADO**

[00207] Este Exemplo ilustra a atividade inibidora exibida pelas proteínas inseticidas quiméricas contra pragas de lepidópteros quando expressas em plantas de milho e fornecidas como uma dieta para a respectiva praga de inseto de milho.

[00208] A variedade de milho LH244 foi transformada com os vetores de transformação binária descritos no Exemplo 4 usando um método de transformação mediado por *Agrobacterium*. As células transformadas foram induzidas a formar plantas por métodos conhecidos na técnica. Bioensaios usando discos de folhas de plantas foram realizados análogos aos descritos na patente nº US 8.344.207. Uma planta LH244 não transformada foi usada para obter o tecido a ser usado como um controle negativo. Múltiplos eventos de transformação de cada vetor binário foram avaliados contra lagarta-do-milho (CEW, *Helicoverpa zea*), lagarta-militar (FAW, *Spodoptera frugiperda*), lagarta-negra (BCW, *Agrotis ipsilon*) e broca-do-milho-do-sudoeste (SWCB, *Diatraea grandiosella*).

[00209] O bioensaio de disco de folha foi realizado em plantas transgênicas de geração R0 e F1. Além disso, as classificações de dano à folha foram avaliadas para todas as plantas de F1 transgênicas que expressam certas proteínas inseticidas quiméricas infestadas com as pragas de inseto lepidóptero. Eventos transgênicos de F1 que expressam TIC860 e TIC868 também foram avaliados para atividade no campo contra FAW, CEW e SWCB. Os resultados do ensaio são mostrados na Tabela 4. Um sinal '+' indica a atividade observada para a praga de inseto específica. Como pode ser visto na Tabela 4, a maioria das proteínas inseticidas quiméricas e muitas das variantes de proteína inseticida quimérica demonstrou atividade contra uma ou mais espécies de pragas lepidópteros.

**TABELA 4. ATIVIDADE DE BIOENSAIO DE PROTEÍNAS INSETICIDAS QUIMÉRICAS DE TECIDO DE FOLHA DE MILHO ESTAVELMENTE TRANSFORMADA**

Toxina	SEQ ID NO DE PRT:	Inseto																		
		VBC	SCB	LSC	B	CEW	SPW	CBW	BLAW	TBW	SBL	SAW	FAW	BAW	OBW	OLW	PBW	BCW	SWCB	ECB
TIC1100	4	+	+						+			+			+	+				
TIC860	7	+	+	+					+	+	+	+	+	+		+	+		+	+
TIC867	10	+	+						+		+		+	+	+	+			+	
TIC867_20	13	NT	NT	NT			NT	NT	NT	NT	NT			NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
TIC867_21	16	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT			NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
TIC867_22	19	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+	NT	NT						
TIC868	28	+	+				+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TIC868_10	33	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+	NT	NT						
TIC868_11	36	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+	NT	NT						
TIC868_12	39	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+	NT	NT						
TIC869	50	+	+								+	+	+						+	
TIC836	53	+							+		+	+	+							

**EXEMPLO 6****ATIVIDADE DE LEPIDÓPTEROS DAS PROTEÍNAS INSETICIDAS QUIMÉRICAS EM SOJA ESTAVELMENTE TRANSFORMADO**

[00210] Este Exemplo ilustra a atividade inibidora exibida pelas proteínas inseticidas quiméricas contra pragas de lepidópteros quando expressas em plantas de soja e fornecidas como uma dieta para a respectiva praga de inseto de soja.

[00211] As sequências codificantes para proteínas inseticidas quiméricas selecionadas foram reprojetadas para expressão em plantas, clonadas num vetor de transformação de plantas binário, e usadas para transformar células vegetais de soja. Os vetores de transformação de plantas compreendem um primeiro cassete de transgene para expressão da proteína inseticida quimérica, conforme descrito no Exemplo 4 e um segundo cassete de transgene para a seleção de células vegetais transformadas, usando a seleção com espectinomicina. Em alguns exemplos, como no caso de TIC1100, TIC860 e TIC836, uma sequência de codificação de peptídeo de trânsito de cloroplasto estava operativamente ligada à sequência de codificação de inseticida quimérica. Os ensaios foram realizados com plastídeo direcionado e TIC1100, TIC860 e TIC836 não direcionados. A Tabela 5 abaixo mostra o inseticida variante quimérica e proteína inseticida quimérica TIC867 e sequências codificantes associadas usadas para a expressão em plantas de soja estavelmente transformadas.

[00212] Células de plantas de soja foram transformadas com o vetor de transformação binários descritos acima pela transformação mediada de *Agrobacterium*. As células de plantas transformadas resultantes foram induzidas a formar plantas de soja integrais. O tecido foliar foi colhido e utilizado no bioensaio como descrito no Exemplo 5 ou, alternativamente, tecido liofilizado foi utilizado na dieta de insetos para bioensaio. O bioensaio foi realizado contra FAW, lagarta da vagem

(SAW, *Spodoptera eridania*), larva de soja (SBL, *Chrysodeixis includens*), lagarta-do-algodoeiro (SPW, *Helicoverpa zea*), lagarta-dasoja (VBC, *Anticarsia gemmatalis*), lagarta do tabaco (TBW, *Heliothis virescens*, lagarta de preto (BLAW, *Spodoptera cosmioides*), lagarta-elasma (LSCB, *Elasmopalpus lignosellus*) e lagarta helicoverpa (OBW, *Helicoverpa armigera*).

[00213] A Tabela 5 mostra a atividade contra as espécies selecionadas de Lepidópteros para cada proteína inseticida em plantas de geração de R0, em que '+' indica a atividade. Conforme pode ser visto na Tabela 5, cada uma dentre as proteínas inseticidas quiméricas expressas em soja estavelmente transformada demonstraram atividade contra várias espécies de lepidópteros. Se observa, particularmente, é que a variante TIC867, TIC867\_23 demonstrou atividade contra SPW.

**TABELA 5. ATIVIDADE DE BIOENSAIO DE PROTEÍNAS INSETICIDAS QUIMÉRICAS DE TECIDO DE FOLHA DE SOJA R0 ESTAVELMENTE TRANSFORMADA.**

Proteína Inseticida	FAW	SAW	SBL	SPW	VBC	TBW	BLAW	LSCB	OBW
TIC1100	+	+	+		+		+	+	+
TIC860	+	+	+		+			+	
TIC867	+	+	+		+	+		+	
TIC867_20		+	+						
TIC867_21		+	+						
TIC867_22		+	+						
TIC867_23	+	+	+	+					
TIC867_24		+	+						
TIC867_25		+	+						
TIC868	+		+		+		+	+	
TIC869			+		+	+		+	
TIC836	+	+	+		+	+	+		+

[00214] Os eventos transformados selecionados foram permitidos auto-polinizar e a semente resultante foi cultivada. O tecido foliar foi colhido a partir das plantas de geração R1 e usado num bioensaio de alimentação. As plantas de R1 que expressam TIC1100, TIC860, TIC867, TIC868, TIC869 e TIC836 foram ensaiadas quanto a atividade contra SAW, SBL, SPW e VBC. A Tabela 6 mostra a atividade observada nestes testes. Um sinal '+' indica a atividade observada para a praga de inseto específica. Conforme demonstrado na Tabela 6, a maior parte das proteínas inseticidas químéricas expressas a partir de plantas de geração de R1 demonstraram atividade para uma ou mais espécies de Lepidópteros.

**TABELA 6. ATIVIDADE DE BIOENSAIO DE PROTEÍNAS INSETICIDAS QUIMÉRICAS DE TECIDO DE FOLHA DE SOJA R1 ESTAVELMENTE TRANSFORMADA.**

Toxina	SAW	SBL	SPW	VBC
TIC1100	+	+		+
TIC860	+	+		+
TIC867	+			
TIC868	+	+		+
TIC869	+	+		+
TIC836	+	+		+

[00215] A Tabela 7 demonstra os resultados de testes de campo realizados em estufas com plantas de soja de geração de R1 estavelmente transformadas expressando TIC1100, TIC860 e TIC836. As espécies utilizadas para infestar plantas nas estufas incluem SAW, SBL e SPW. A resistência foi definida como sendo inferior ou igual a quinze por cento de desfolhamento em plantas de soja. A resistência observada nestes ensaios de gaiola é consistente com a resistência observada no ensaio de tecido de folha de soja de geração de R1

apresentada na tabela 6. Um sinal ‘+’ indica a atividade observada para a praga de inseto específica.

**TABELA 7. PERFIL DE ATIVIDADE DE TIC1100, TIC860 E TIC836 EXPRESSOS EM SOJA DE GERAÇÃO DE R1 TESTADA EM TESTES EM CAMPO DE ESTUFA.**

Toxina	SAW	SBL	SPW
TIC1100	+	+	
TIC860	+	+	
TIC836	+	+	

[00216] Os testes de campo em estudas com plantas de soja de geração de R1 estavelmente transformado que expressam TIC867 e TIC869 também foram conduzidos em duas localizações diferentes na Argentina, Acevedo e Fontezuela. As espécies usadas para infestar plantas nas estufas incluem lagarta da vagem (SABW, *Helicoverpa gelotopeon*), VBC, BLAW, e Lagarta do girassol (SFL, *Rachiplusia nu*). A resistência foi definida como sendo inferior ou igual a quinze por cento de desfolhamento em plantas de soja. A Tabela 8 abaixo mostra a resistência observada. Um sinal ‘+’ indica a atividade observada para a praga de inseto específica. Conforme demonstrado na Tabela 8, plantas de soja transgênica que expressam TIC867 demonstraram resistência à BLAW e VBC. Plantas de soja transgênica que expressam TIC869 demonstraram resistência à SABW, SFL, BLAW e VBC.

**TABELA 8. PERFIL DE ATIVIDADE DE TIC867 E TIC869 EXPRESSOS EM SOJA DE GERAÇÃO DE R1 TESTADA EM TESTES EM CAMPO DE ESTUFA.**

Toxina	Acevedo			Fontezuela		
	SABW	SFL	VBC	SABW	BLAW	VBC
TIC867			+		+	+
TIC869		+	+	+	+	+

**EXEMPLO 7:****ATIVIDADE DE LEPIDÓPTEROS DAS PROTEÍNAS INSETICIDAS QUIMÉRICAS EM ALGODÃO ESTAVELMENTE TRANSFORMADO**

[00217] Este Exemplo ilustra a atividade inibidora exibida pelas proteínas inseticidas quiméricas contra pragas de lepidópteros quando expressas em plantas de algodão e fornecidas como uma dieta para a respectiva praga de inseto.

[00218] As sequências codificantes para proteínas inseticidas quiméricas selecionadas foram reprojetadas para expressão em plantas, clonadas num vetor de transformação de plantas binário, e usadas para transformar células vegetais de algodão. Os vetores binários resultantes foram semelhantes àqueles descritos no Exemplo 4 e foram usados para expressar plastídeo direcionado e TIC860 não direcionado (sequência de codificação: SEQ ID NO: 6; sequência proteica: SEQ ID NO: 7), TIC867 (sequência de codificação: SEQ ID NO: 9; sequência proteica: SEQ ID NO: 10), TIC868 (sequência de codificação: SEQ ID NO: 27; sequência proteica: SEQ ID NO: 28) e TIC867\_23 (sequência de codificação: SEQ ID NO: 20; sequência proteica: SEQ ID NO: 23).

[00219] As células vegetais de algodão foram transformadas por um método de transformação mediado por *Agrobacterium*. As células de algodão transformadas foram induzidas a formar plantas inteiras. O tecido de folha de algodão foi usado no bioensaio conforme descrito no Exemplo 5 contra Lagarta-da-Espiga (CBW, *Helicoverpa zea*), FAW, TBW e SBL. A Tabela 9 mostra a atividade observada contra estas espécies de Lepidópteros para TIC860, TIC867 e TIC868 em algodão de geração de R0 estavelmente transformado, em que '+' indica a atividade. Conforme pode ser visto na Tabela 9, TIC860, TIC867 e TIC868 demonstram a atividade contra duas ou mais espécies de pragas de Lepidópteros algodão de geração de R0 estavelmente transformado.

**TABELA 9. ATIVIDADE DE BIOENSAIO DE TIC860, TIC867 E TIC868 A PARTIR DE TECIDO DE FOLHA DE ALGODÃO R0 ESTAVELMENTE TRANSFORMADO.**

Toxina	CBW	FAW	TBW	SBL
TIC860		+		+
TIC867	+	+	+	NT
TIC868		+		+

[00220] Os eventos de transformação selecionados foram usados para produzir semente de R1. Plantas de R1 que expressa TIC860, TIC867 e TIC868 foram testados quanto a resistência a CBW, FAW, TBW e SBL. Tecidos de folha, quadrados e cápsula foram utilizados no ensaio. A Tabela 10 mostra a atividade observada nestes testes. Um sinal ‘+’ indica a atividade observada para a praga de inseto específica. Conforme demonstrado na Tabela 10, TIC860 demonstrou atividade contra FAW no tecido de folha. Adicionalmente, a proteína insecticida químérica TIC867 demonstrou atividade contra CBW e FAW NOs tecidos de folha, quadrados e de cápsulas, bem como TBW e SBL na folha. A proteína insecticida químérica TIC868 demonstrou atividade contra FAW NOs tecidos de folhas, quadrados e de cápsulas, bem como TBW e SBL na folha.

**TABELA 10. ATIVIDADE DE BIOENSAIO DE PROTEÍNAS INSETICIDAS QUIMÉRICAS DE TECIDO DE FOLHA DE ALGODÃO R1 ESTAVELMENTE TRANSFORMADA.**

Toxina	CBW			FAW			TBW	SBL
	Folha	Qua-drado	Cápsula	Folha	Qua-drado	Cápsula	Folha	Folha
TIC860				+				
TIC867	+	+	+	+	+	+	+	+
TIC868				+	+	+	+	+

**EXEMPLO 8****CLONAGEM DE SEQUÊNCIAS CODIFICANTES DE INSETICIDA QUIMÉRICA INVADORA COM LEPIDÓPTERO ATIVO**

[00221] Sequências de ácidos nucléicos recombinantes foram construídas a partir dos genes de proteína Cry conhecidas usadas para produzir sequências codificantes que codificam proteínas inseticidas quiméricas inovadoras. As sequências codificantes foram clonadas no vetor de plasmídeo de expressão *Bacillus thuringiensis* (Bt). Após a confirmação da sequência clonada, o plasmídeo de expressão foi transformado em Bt e expressa. As preparações das proteínas Cry quiméricas inovadoras expressas foram ensaiadas quanto a atividade contra várias pragas de lepidópteros. Muitas sequências codificantes que codificam proteínas inseticidas quiméricas foram produzidas e testadas no bioensaio. Nem todas dentre as proteínas inseticidas quiméricas demonstraram atividade. Apenas algumas dentre as proteínas inseticidas quiméricas foram selecionadas com base em suas atividades para especificar Lepidoptera, e são apresentadas na Tabela 11 abaixo.

**TABELA 11. PROTEÍNAS PESTICIDAS QUIMÉRICAS INOVADORAS E SUAS SEQUÊNCIA DE CODIFICAÇÃO BACTERIANA E SEQUÊNCIA PROTÉICA CORRESPONDENTES.**

Proteína Pesticida	SEQ ID NO de DNA Bacteriano:	SEQ ID NO de Proteína:
TIC713	54	55
TIC843	56	57
TIC862	58	59
TIC1099	60	61
TIC1103	78	79

Proteína Pesticida	SEQ ID NO de DNA Bacteriano:	SEQ ID NO de Proteína:
TIC1101	80	81
TIC845	82	83
TIC846	84	85
TIC858	86	87
TIC865	88	89
TIC866	90	91
TIC838	92	93
TIC839	94	95
TIC841	96	97
TIC842	98	99
TIC850	100	101
TIC859	102	103
TIC861	104	105
TIC848	106	107
TIC849	108	109
TIC847	110	111

#### **EXEMPLO 9**

**AS PROTEÍNAS INSETICIDAS QUIMÉRICAS INOVADORAS DEMONSTRAM ATIVIDADE CONTRA PRAGAS DE LEPIDÓPTEROS.**

[00222] Sequências codificantes que codificam proteínas inseticidas quiméricas foram expressas em *Bt*. As proteínas expressas foram, então, ensaiadas contra uma variedade de *Lepidoptera* conhecido como pragas de milho, cana-de-açúcar, soja e algodão, bem como outras

plantas de colheita. As proteínas inseticidas foram ensaiadas quanto a atividade contra lagarta-da-soja (VBC, *Anticarsia gemmatalis*), broca da cana-de-açúcar borer (SCB, *Diatraea saccharalis*), lagarta-elasma (LSCB, *Elasmopalpus lignosellus*), lagarta-do-algodão (CEW, *Helicoverpa zea*), Lagarta-do-tabaco (TBW, *Heliothis virescens*), larva de soja (SBL, *Chrysodeixis includens*), lagarta da vagem (BLAW, *Spodoptera cosmioides*), larva da vagem (SAW, *Spodoptera eridania*), lagarta-militar (FAW, *Spodoptera frugiperda*), Lagarta da beterraba (BAW, *Spodoptera exigua*), Lagarta helicoverpa (OBW, *Helicoverpa armigera*), curuquerê-oriental (OLW, *Spodoptera litura*), Larva rosada (PBW, *Pectinophora gossypiella*), lagarta-negra (BCW, *Agrotis ipsilon*), Broca-do-milho-do-sudoeste (SWCB, *Diatraea grandiosella*) e Broca europeia do milho (ECB, *Ostrinia nubilalis*). lagarta-do-algodão (CEW, *Helicoverpa zea*) também é chamado de Verme da semente de soja (SPW) e Lagarta do algodão (CBW). A atividade foi determinada através de uma combinação de mortalidade e indicações de crescimento bem como indicações de MIC50. MIC50 se refere a uma concentração de inibição de exúvia em que tanto a larva morta quanto as larvas L1 (larvas que falharam em exuviar para segundos ínstars) são fatoradas na indicação. A Tabela 12 abaixo mostra a atividade de cada proteína inseticida químérica. Um sinal ‘+’ indica a atividade observada à praga de inseto específica.

**TABELA 12. ATIVIDADE DE BIOENSAIO CONTRA *LEPIDOPTERA* SELECIONADO.**

SEQ ID NO DE PRT:	Insto																
	VBC	SCB	LSCB	CEW SPW CBW	TBW	SBL	BLAW	SAW	FAW	BAW	OBW	OLW	PBW	BCW	SWCB	ECB	
55	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+	+	
57	+	+	+	+	+	+	+			+		+	+		+		
59	+	+	+	+	+	+		+	+						+		
61	+	+		+		+	+		+	+	+	+	+		+	+	
79	+	+		+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	
81	+	+				+	+										
83	+	+				+		+		+			+		+		
85	+	+				+		+				+					
87	+	+				+		+		+		+	+		+		
89	+	+	+		+	+	+	+	+						+		
91	+	+				+			+			+			+		
93	+	+	+		+	+											
95	+	+				+	+	+							+		

SEQ ID NO DE PRT:	Insto																
	VBC	SCB	LSCB	CEW SPW CBW	TBW	SBL	BLAW	SAW	FAW	BAW	OBW	OLW	PBW	BCW	SWCB	ECB	
97	+	+				+	+						+		+		
99	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	
101	+					+	+	+	+	+		+		+	+	+	
103	+	+			+	+	+	+	+	+		+		+	+	+	
105	+	+				+		+									+
107	+	+		+	+	+	+		+	+		+	+				
109	+	+		+	+	+	+		+	+		+	+				
111	+	+			+	+		+	+			+	+		+		

[00223] Conforme pode ser observado na Tabela 12 acima, todas as proteínas inseticidas químicas exibiram atividade contra múltiplas espécies Lepidópteros.

#### **EXEMPLO 10**

#### **VARIANTES DE AMINOÁCIDO DE TIC1099 DEMONSTRAM ATIVADE DE LEPIDÓPTEROS**

[00224] A sequência de codificação para TIC1099 (SEQ ID NO: 60) foi modificada pelos métodos conhecidos na técnica para alterar aminoácidos específicos a partir da sequência de proteína TIC1099 original (SEQ ID NO: 61). As variantes resultantes foram ensaiadas quanto a atividade contra a *Lepidoptera* selecionada. A Tabela 13 abaixo mostra as variantes TIC1099 e o DNA e a SEQ ID NOs de proteína correspondentes.

**TABELA 13. VARIANTES DE TIC1099**

<b>Variante de TIC1099</b>	<b>SEQ ID NO de DNA:</b>	<b>SEQ ID NO de PRT:</b>
TIC1099-T507E	62	63
TIC1099-R522K	64	65
TIC1099-K490S	66	67
TIC1099-T562R	68	69
TIC1099-S553R	70	71
TIC1099-G498D	72	73
TIC1099-K490A	74	75
TIC1099-E564A	76	77

[00225] Cada variante foi ensaiada quanto a mortalidade e o crescimento contra lagarta-militar (FAW, *Spodoptera frugiperda*), lagarta-do-algodão (CEW, *Helicoverpa zea*), lagarta-negra (BCW, *Agrotis ipsilon*), larva de soja (SBL, *Chrysodeixis includens*) e Broca-do-milho-do-sudoeste (SWCB, *Diatraea grandiosella*). A Tabela 14 abaixo

mostra a atividade contra cada Praga de Lepidópteros. A atividade é classificada de ‘+’ a ‘++++’ com base na porcentagem de mortalidade.

**TABELA 14. ATIVIDADE DE *LEPIDOPTERA* DE VARIANTES DE TIC1099.**

Variante de TIC1099	SEQ ID NO de PRT:	FAW	CEW	BCW	SBL	SWCB
TIC1099	61	++++	+++	++++	++++	+++
TIC1099-T507E	63	++++	++++	++++	++++	++++
TIC1099-R522K	65	++++	++++	++++	+++	++++
TIC1099-K490S	67	++++	+++	+++	++	+
TIC1099-T562R	69	++++	++++	+++	++++	++++
TIC1099-S553R	71	++++	++++	+++	+++	+++
TIC1099-G498D	73	++++	+++	+++	+++	+++
TIC1099-K490A	75	+++	+++	+++	+++	+++
TIC1099-E564A	77	+++	++	+++	+	+

[00226] Todas dentre as variantes de TIC1099 demonstraram atividade contra as cinco espécies de Lepidópteros testadas. Algumas dentre as variantes demonstraram atividade inferior quando comparadas às outras para pragas específicas.

### **EXEMPLO 11**

#### **AS PROTEÍNAS INSETICIDAS QUIMÉRICAS EXPRESSAS EM MILHO ESTAVELMENTE TRANSFORMADO DEMONSTRARAM ATIVIDADE CONTRA PRAGAS DE LEPIDÓPTEROS.**

[00227] Sequências codificantes sintética foram construídos para o uso na expressão da proteína codificada em plantas, clonada num vetor de transformação de planta binário, e usada para transformar células vegetais de milho. Os vetores de transformação de planta compreenderam um primeiro cassete de transgene para a expressão da

proteína inseticida quimérica que compreendeu um promotor constitutivo, 5' ligado operativamente a um líder, 5' ligado operativamente a um ítron, 5' ligado operativamente à sequência de codificação proteína inseticida quimérica, que foi, por sua vez, 5' ligada operativamente a um 3' UTR e; um segundo cassete de transgene para a seleção de células vegetais transformadas usando seleção de glifosato. A Tabela 15 abaixo mostra as sequências codificantes de proteína inseticida quimérica usadas para a expressão no milho e nas SEQ ID NOs correspondentes.

**TABELA 15. SEQUÊNCIAS CODIFICANTES DE PROTEÍNA INSETICIDA E SEQ ID NOS CORRESPONDENTES.**

Proteína Inseticida	SEQ ID NO DE DNA:	SEQ ID NO DE PRT:
TIC713	112	55
TIC713	113	55
TIC843	114	57
TIC862	115	59
TIC1099	116	61
TIC1103	117	79
TIC845	118	83
TIC846	119	85
TIC858	120	87
TIC866	121	91
TIC838	122	93
TIC841	123	97
TIC842	124	99

Proteína Inseticida	SEQ ID NO DE DNA:	SEQ ID NO DE PRT:
TIC850	125	101
TIC859	126	103
TIC861	127	105
TIC848	128	107
TIC849	129	109
TIC847	130	111

[00228] A variedade de milho LH244 foi transformada com os vetores de transformação binária descritos acima usando um método de transformação mediado por *Agrobacterium*. As células transformadas foram induzidas para formar plantas por métodos conhecidos na técnica. Os bioensaios que usam discos de folha de planta foram realizados análogos àqueles descritos na Patente nº U.S.8.344.207. Uma planta LH244 não transformada foi usada para obter tecido para ser usado como um controle negativo. Múltiplos eventos de transformação a partir de cada vetor binário foram ensaiados contra lagarta-do-algodão (CEW, *Helicoverpa zea*), lagarta-militar (FAW, *Spodoptera frugiperda*), lagarta-negra (BCW, *Agrotis ipsilon*) e Broca-do-milho-do-sudoeste (SWCB, *Diatraea grandiosella*). Os resultados de ensaio são mostrados na Tabela 16 abaixo em que '+' indica a atividade.

**TABELA 16. BIOENSAIO ATIVIDADE DE PROTEÍNAS INSETICIDAS QUIMÉRICAS A PARTIR DE TECIDO DE FOLHA DE MILHO ESTAVELMENTE TRANSFORMADO.**

Proteína Inseticida	CEW	FAW	BCW	SWCB
TIC713	+	+		+

Proteína Inseticida	CEW	FAW	BCW	SWCB
TIC843	+	+		+
TIC862	+	+		+
TIC1099	+	+	+	+
TIC1103	+	+		+
TIC845	+	+		+
TIC846	+	+		+
TIC858	+	+		+
TIC866	+	+		+
TIC838		+		+
TIC841	+	+		+
TIC842	+	+	+	+
TIC850	+	+		+
TIC859	+	+		+
TIC861	+	+		+
TIC848	+	+		+
TIC849	+	+		+
TIC847		+		+

[00229] Conforme pode ser observado na Tabela 16 acima, todas as proteínas inseticidas químéricas demonstraram atividade contra duas ou mais espécies de Lepidópteros.

### **EXEMPLO 12**

### **AS PROTEÍNAS INSETICIDAS QUIMÉRICAS EXPRESSAS NA SOJA ESTAVELMENTE TRANSFORMADA DEMONSTRARAM ATIVIDADE**

## CONTRA PRAGAS DE LEPIDÓPTEROS.

[00230] As sequências codificantes para as proteínas inseticidas químéricas selecionadas foram reprojetadas para expressão de planta, clonadas num vetor de transformação de planta binário, e usadas para transformar células vegetais de soja. Os vetores de transformação de planta compreenderam um primeiro cassete de transgene para a expressão da proteína inseticida químérica que compreendeu um promotor constitutivo, 5' ligado operativamente a um líder, 5' ligado operativamente à proteína inseticida químérica sequência de codificação, que por sua vez foi 5' ligado operativamente a um 3' UTR e; um segundo cassete de transgene para a seleção de células vegetais transformadas usando seleção de espectinomicina. A Tabela 17 abaixo mostra as sequências codificantes de proteína inseticida químérica usadas para a expressão na soja e as SEQ ID NOs correspondentes.

**TABELA 17. SEQUÊNCIAS CODIFICANTES DE PROTEÍNA INSETICIDA E SEQ ID NOS CORRESPONDENTES.**

Proteína Inseticida	SEQ ID NO DE DNA:	SEQ ID NO DE PRT:
TIC1103	117	79
TIC866	121	91
TIC842	124	99
TIC849	129	109

[00231] As células vegetais de soja foram transformadas usando os vetores de transformação binária descritos acima pela transformação mediada por *Agrobacterium*. As células vegetais transformadas resultantes foram induzidas para formar plantas de soja inteiras. O tecido de folha foi colhido e usado no bioensaio conforme descrito no Exemplo 11 ou, alternativamente, o tecido liofilizado foi usado na dieta de inseto para o bioensaio. O bioensaio foi realizado contra lagarta-militar (FAW, *Spodoptera frugiperda*), lagarta da vagem (SAW, *Spodoptera eridania*),

larva de soja (SBL, *Chrysodeixis includens*), lagarta-do-algodão (SPW, *Helicoverpa zea*), lagarta-da-soja (VBC, *Anticarsia gemmatalis*), larva de soja (SBL, *Chrysodeixis includens*), Lagarta-do-tabaco (TBW, *Heliothis virescens*), lagarta da vagem (BLAW, *Spodoptera cosmioides*), lagarta da vagem (SAW, *Spodoptera eridania*), lagarta-elasma (LSCB, *Elasmopalpus lignosellus*) e Lagarta helicoverpa (OBW, *Helicoverpa armigera*). A Tabela 18 abaixo mostra a atividade contra espécies selecionadas de Lepidoptera para cada Proteína Inseticida nas plantas de geração de R0.

**TABELA 18. ATIVIDADE DE DE PROTEÍNAS INSETICIDAS QUIMÉRICAS A PARTIR DE TECIDO DE FOLHA DE SOJA DE R0 ESTAVELMENTE TRANSFORMADA.**

Proteína Inseticida	FA W	SAW	SBL	SPW	VBC	TBW	BLAW	SAW	LSCB	OBW
TIC1103		+	+	+	+	+			+	+
TIC866	+		+		+				+	+
TIC842	+	+	+		+	+	+	+	+	+
TIC849		+	+	+	+	+			+	

[00232] Conforme pode ser observado na Tabela 18, cada uma dentre as proteínas inseticidas quiméricas expressas na soja estavelmente transformada demonstrou atividade contra múltiplas espécies de Lepidópteros.

[00233] Os eventos transformados selecionados foram permitidos se auto-polinizar e a semente resultante foi cultivada. Tecido de folha foi colhido a partir das plantas de geração de R1 e usada num bioensaio de alimentação. A Tabela 19 mostra a atividade observada contra espécies de Lepidópteros selecionadas a partir das proteínas inseticidas expressas no tecido de folha de soja de geração de R1.

**TABELA 19. ATIVIDADE DE BIOENSAIO DE PROTEÍNAS INSETICIDAS QUIMÉRICAS A PARTIR DE TECIDO DE FOLHA DE**

## SOJA DE R1 ESTAVELMENTE TRANSFORMADA.

Toxin	SAW	SBL	SPW	VBC
TIC1103		+	+	+
TIC866	+	+		+
TIC842		+	+	
TIC849		+	+	

[00234] Conforme pode ser observado na Tabela 19 acima, as proteínas inseticidas químéricas expressas a partir das plantas de geração de R1 demonstraram atividade para duas ou mais espécies de Lepidópteros.

[00235] Todas as composições divulgadas e aqui reivindicadas no presente documento podem ser feitas e executadas sem experimentação indevida à luz da presente divulgação. Embora as composições desta invenção tenham sido descritas em termos das modalidades ilustrativas precedentes, será evidente para os versados na técnica que podem ser aplicadas variações, mudanças, modificações e alterações às composições descritas no presente documento sem se afastar do verdadeiro conceito, essência e escopo da divulgação. Mais especificamente, será aparente que determinados agentes que são química e fisiologicamente relacionados podem ser substituídos pelos agentes descritos no presente documento enquanto os mesmos ou resultados semelhantes seriam atingidos. Todos esses substitutos e modificações semelhantes aparentes àqueles versados na técnica são considerados como estando dentro da essência, âmbito e conceito da invenção conforme definido pelas reivindicações anexas.

[00236] Todas as publicações e documentos de patentes publicados no relatório descritivo são incorporados ao presente documento a título de referência na sua totalidade como se cada publicação ou pedido de patente individual fosse específica ou individualmente indicado para ser incorporado por referência.

## REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de ácido nucleico recombinante, caracterizada pelo fato de que compreende um promotor heterólogo operacionalmente ligado a um segmento de polinucleotídeo compreendendo uma sequência como apresentada na SEQ ID NO: 9 ou uma sequência degenerada da mesma que codifica a mesma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 10.

2. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o referido segmento de polinucleotídeo codifica uma proteína inseticida quimérica como apresentada na SEQ ID NO: 10.

3. Polinucleotídeo caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência como apresentada na SEQ ID NO: 9 ou 27 ou uma sequência degenerada da mesma que codifica a mesma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 10.

4. Proteína inseticida quimérica, caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 10.

5. Proteína inseticida quimérica, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que a proteína inseticida quimérica exibe atividade inibidora contra uma espécie de inseto da ordem Lepidoptera.

6. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende um polinucleotídeo como apresentado na SEQ ID NO: 9, sendo que a célula hospedeira é uma célula hospedeira bacteriana.

7. Composição inibidora de inseto, caracterizada pelo fato de que compreende uma proteína inseticida quimérica compreendendo uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 10.

8. Método para controlar uma praga de lepidópteros, caracterizado pelo fato de que compreende colocar a praga de

lepidóptero em contato com uma quantidade inibidora de uma proteína inseticida quimérica compreendendo uma sequência de aminoácidos como apresentada em SEQ ID NO: 10.

9. Método para controlar uma praga de lepidópteros, caracterizado pelo fato de que compreende expor a praga a uma célula de planta transgênica, planta ou parte de planta, sendo que a referida célula de planta, planta ou parte de planta expressa um polinucleotídeo como apresentado na SEQ ID NO: 9.