



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0720135-4 B1

(22) Data do Depósito: 10/12/2007

(45) Data de Concessão: 03/10/2017



(54) Título: MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, VETOR, CASSETE DE EXPRESSÃO, MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE UMA CÉLULA HOSPEDEIRA, PARA OBTENÇÃO DE UMA PLANTA TRANSGÊNICA E PARA PRODUZIR UMA PLANTA COM RESISTÊNCIA A INSETOS AUMENTADA, POLIPEPTÍDEO E POLINUCLEOTÍDEO

(51) Int.Cl.: C12N 15/82; C07K 14/325; A01H 5/00

(30) Prioridade Unionista: 08/12/2006 US 60/873,849

(73) Titular(es): PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC.

(72) Inventor(es): DAVID CERF; KEVIN MCBRIDE; TAKASHI YAMAMOTO; RUTH CONG; MICHAEL FREEMAN

MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, VETOR, CASSETE DE EXPRESSÃO, MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE UMA CÉLULA HOSPEDEIRA, PARA OBTENÇÃO DE UMA PLANTA TRANSGÊNICA E PARA PRODUZIR UMA PLANTA COM RESISTÊNCIA A INSETOS AUMENTADA, POLIPEPTÍDEO E POLINUCLEOTÍDEO

[0001] Este pedido é um pedido não provisório do pedido da patente Ser. No. 60/873.849, depositado em 8 de dezembro de 2006, conteúdos os quais são aqui incorporados por referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0002] A presente invenção se refere geralmente ao controle de pragas no campo e provê polipeptídeos inseticidas relacionados aos polipeptídios Cry1 de *Bacillus thuri* e os polinucleotídeos que os codificam. A presente invenção também se refere aos métodos e composições para alterar a resistência de plantas à predação por insetos incluindo, mas não se limitando a, produção de plantas transgênicas.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[0003] Numerosas plantas comercialmente valiosas, incluindo plantas de cultivo agrícola comuns, são suscetíveis a ataques por insetos e nematódeos. Estas pragas podem causar uma redução substancial na produtividade e qualidade das plantas de cultivos. Tradicionalmente, fazendeiros tem contado pesadamente com pesticidas químicos para combater os danos por

pragas. Entretanto, o uso de pesticidas químicos possui seus próprios problemas, incluindo o custo e a inconveniência da aplicação dos pesticidas. Além do mais, resíduos químicos causam preocupações ambientais e de saúde. Por isso e outros motivos, existe uma demanda por agentes inseticidas alternativos.

[0004] Uma outra abordagem ambientalmente viável para o controle de pragas é o uso das proteínas cristalinas pesticidas derivadas da bactéria de solo *Bacillus thuringiensis* ("Bt"), normalmente chamadas de "proteínas Cry". As proteínas Cry são moléculas globulares de proteínas que se acumulam como pró-toxinas em formas cristalinas durante o estágio tardio da esporulação de *Bacillus thuringiensis*. Após a ingestão pela praga, os cristais são solubilizados para liberar pró-toxinas no ambiente alcalino do intestino médio da larva. Pró-toxinas (~130 kDa) são convertidas em fragmentos maduros tóxicos (região N terminal de ~66 kDa) pelas proteases do intestino. Muitas destas proteínas são muito tóxicas para determinados insetos alvos, mas inofensivas para plantas e outros organismos não atingidos. Algumas proteínas Cry têm sido expressas de forma recombinante em plantas cultivadas para criar plantas transgênicas resistente a pragas. Entre estas, plantas de algodão e milho transgênicos para Bt têm sido amplamente cultivadas.

[0005] Um grande número de proteínas Cry tem sido isolado caracterizado e classificado baseado na homologia de sequência de amino ácidos (Crickmore et al., 1998, *Microbiol. Mol. Biol.*

Rev., 62: 807-813). Este esquema de classificação estabelece um mecanismo sistemático para nomear e categorizar proteínas Cry recentemente descobertas. A classificação de Cry1 é a melhor conhecida e contém o maior número de genes cry com um total atual de mais de 130.

[0006] Tem sido geralmente verificado que proteínas Cry individuais possuem espectro de atividade estreito. Por exemplo, Cry1Ac foi a primeira toxina a ser utilizada em algodão transgênico para o controle das pragas dos insetos *H. virescens* e *H. zea*. Esta toxina é conhecida pelo seu alto nível de toxicidade para *H. virescens*. Entretanto, ela é levemente deficiente em sua habilidade de controlar *H. zea* e possui praticamente nenhuma atividade em espécies de *Spodoptera*. Adicionalmente, a toxina Cry1Ab possui uma atividade levemente menor em *H. zea* quando comparado a Cry1Ac, mas possui uma atividade muito superior contra *S. exigua*.

[0007] Plantas de cultivo transgênicas de segunda geração poderiam ser mais resistentes a insetos se eles fossem capazes de expressar múltiplos e/ou novos genes *Bt*. Portanto, novas proteínas inseticidas possuindo um amplo espectro de atividade seriam altamente desejáveis.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0008] A presente invenção se refere aos polipeptídeos Cry derivados de polipeptídeos de *Bacillus thuringiensis* (ex. Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ae, Cry1Ag, e Cry1Ca)

incluindo, mas não limitado a, os polipeptídeos derivados de Cry1 com SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, e 28. Em adição às sequências polipeptídicas dos polipeptídeos derivados de Cry1, irá ser notado que polipeptídeos da invenção também incluem variantes destes, incluindo, mas não limitado a, qualquer fragmento incluindo o fragmento maduro da toxina ativado no intestino, análogo, homólogo, alelo de ocorrência natural ou mutante deste. Polipeptídeos da invenção também inclui aqueles peptídeos que são codificados por qualquer ácido nucleico derivado de Cry1 da invenção. Em uma concretização, polipeptídeos misturados que possuem ao menos uma atividade funcional de Cry1 (ex. atividade inseticida) e são ao menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 99.5% idênticos à sequência polipeptídica da porção madura da toxina de qualquer das SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, ou variantes destes. Em outra concretização, polipeptídeos que possuem ao menos uma atividade funcional de Cry1 (ex. atividade inseticida) e são ao menos 99% ou 99.5% idênticos a sequência polipeptídica da porção madura da toxina de qualquer das SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, ou variantes destes. Métodos de produção dos polipeptídeos da invenção, ex., por meios recombinantes, são também estabelecidos. Composições com um ou mais polipeptídeos da invenção são também incluídas.

[0009] A presente invenção também se refere às moléculas de ácidos nucleicos derivados de Cry1 de SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, e 27. Também incluído pela

presente invenção são fragmentos e análogos os quais codificam polipeptídeos que são ao menos em parte funcionalmente ativos ex. eles são capazes de demonstrar uma ou mais funções conhecidas associadas com o polipeptídeo Cry1 de tipo selvagem. Em uma concretização, ele inclui uma molécula misturada de ácido nucleico isolada que é ao menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 99.5% idêntica a qualquer uma SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, ou um complementar deste. Em outra concretização, ele inclui uma molécula de ácido nucleico que é ao menos 99% ou 95% idêntico à sequência polipeptídica da porção madura da toxina de qualquer das SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, ou complementar destes. Vetores constituindo ácidos nucleicos da invenção são também incluídos. Células ou plantas constituindo os vetores da invenção são também incluídas.

[0010] A invenção presente também se refere às plantas transgênicas expressando um ácido nucleico e/ou polipeptídeo da invenção. As plantas transgênicas podem expressar o transgene de qualquer modo conhecido na arte incluindo, mas não limitado a, expressão constitutiva, expressão regulada pelo desenvolvimento, expressão tecido-específica, etc. Sementes obtidas de uma planta transgênica da invenção é também incluída.

[0011] Adicionalmente, é ainda descrito um método de obtenção de uma célula hospedeira, compreendendo a transformação da célula e seu cultivo, bem como, métodos para

obtenção de uma planta transgênica compreendendo a transformação de uma célula, seu cultivo e a regeneração da planta transgênica a partir da célula de planta.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0012] **FIG. 1** mostra a atividade inseticida das variantes isoladas de uma mistura gênica única de Cry1Ab contra *Helicoverpa zea*. Cada uma das pró-toxinas purificadas foi introduzida na dieta de um inseto e a EC₅₀ de cada foi determinada. Os valores de EC₅₀ foram então convertidos para os valores inversos relativos. Ao EC₅₀ de Cry1Ca tipo selvagem contra *H. zea* foi atribuído o valor de 1,0. Ao EC₅₀ das pró-toxinas restantes foi atribuído um valor relativo.

[0013] **FIG. 2** mostra a comparação da atividade relativa da pró-toxina codificada pela variante AR6 misturada com aquela do tipo selvagem de Cry1Ab, Cry1Ac, e Cry1Ca em *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, e *Spodoptera exigua*. Cada uma das pró-toxinas codificadas foi introduzida na dieta de um inseto e a EC₅₀ de cada foi determinada. Os valores de EC₅₀ foram então convertidos para os valores relativos invertidos. À pró-toxina mostrando o menor EC₅₀ (maior atividade específica) para cada tipo de inseto foi atribuído o valor de 1,0. Aos EC₅₀ das pró-toxinas restantes foi atribuído um valor relativo menor.

[0014] **FIG. 3** mostra a eficácia relativa das variantes misturadas de Cry1Ca contra *Spodoptera exigua*. Cada uma das pró-toxinas purificadas foi introduzida na dieta de um inseto

e a EC₅₀ de cada foi determinada. Os valores de EC₅₀ foram então convertidos para os valores relativos inversos. Ao EC₅₀ de Cry1Ca tipo selvagem contra *Spodoptera exigua* foi atribuído o valor de 1,0. Ao EC₅₀ das pró-toxinas restantes foi atribuído um valor relativo.

[0015] **FIG. 4** mostra a expressão dos genes sintéticos AR6 (SEQ ID NO: 5), MR8' (SEQ ID NO: 11), e CR62 (SEQ ID NO: 9) em análise transiente em folhas. Os genes sintéticos foram expressos em folhas de *Nicotiana benthamiana* usando experimentos de infiltração foliar por *Agrobacterium*. Um western blot de extratos foliares resultantes demonstra a produção da pró-toxina a partir dos genes sintéticos de AR6, MR8', e CR62. As pistas são as seguintes: marcador de peso molecular, 100 ng do padrão da pró-toxina Cry1Ca, 200 ng do padrão da pró-toxina Cry1Ca, extrato de folha expressando MR8' sintético, extrato de folha expressando AR6 sintético, extrato de folha expressando CR62 sintético. Um antisoro policlonal de coelho feito contra a proteína Cry1Ca purificada foi utilizada como sonda no western blot (foi predeterminado que o antisoro policlonal contra Cry1Ca possui uma forte reação cruzada com as proteínas AR6, CR62 e MR8').

[0016] **FIGS. 5A-5B** mostram a atividade inseticida *in planta* dos genes sintéticos AR6, MR8', e CR62. Cada variante foi expressa em *N. benthamiana* utilizando infiltração de *Agrobacterium*. Cada disco foliar foi utilizado como alimento para **(A)** *H. zea* ou **(B)** *S. exigua*. Seguindo um período de incubação de 24 horas, a atividade de alimentação foi

determinada por observação visual. Controles positivos para a atividade de *H. zea* e a atividade de *S. exigua* utilizados foram um polipeptídeo Cry2Ab-like (SEQ ID NO: 35) e o gene misturado com Cry1Ca CR62, respectivamente. A proporção demonstrada para cada painel se refere à quantidade relativa de *Agrobacterium* teste contendo o gene de interesse para a de *Agrobacterium* não contendo o gene teste. Essa diluição reduz e eficazmente o nível da proteína teste produzida. Deve-se notar que as folhas do controle negativo infiltradas com *Agrobacterium* que não contém um gene teste foram completamente consumidas pela larva do inseto durante o período de análise (não mostrado).

[0017] **FIG. 6** mostra a atividade *in planta* das variantes misturadas de MR8' contra *H. zea*. A variante indicada foi expressa em folhas de *N. benthamiana* utilizando infiltração de *Agrobacterium* seguido por um período de quatro dias de co-cultivo. Seguindo um período de 24 horas de incubação, a atividade de alimentação foi determinada pelo registro em vídeo do disco foliar. O eixo y corresponde ao número de pixels presente na imagem registrada do disco foliar. Quanto maior o número de pixels, maior a quantidade de folha restante não comido (protegido). O eixo x corresponde à variante testada. A análise foi repetida de duas a quatro vezes como indicado para cada variante.

[0018] **FIG. 7** mostra a atividade *in planta* das variantes misturadas de MR8' contra *S. exigua*. A variedade indicada foi expressa em folhas de *N. benthamiana* utilizando infiltração de

Agrobacterium seguido por um período de quatro dias de co-cultivo. Seguindo um período de 24 horas de incubação, a atividade de alimentação foi determinada pelo registro em vídeo do disco foliar. O eixo y corresponde ao número de pixels presente na imagem registrada do disco foliar. Quanto maior o número de pixels, maior a quantidade de folha restante não comido (protegido). O eixo x corresponde à variante testada. A análise foi repetida três vezes

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0019] A presente invenção provê polipeptídeos inseticidas relacionados dos polipeptídeos Cry1 de *Bacillus* (ex., Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ae, Cry1Ag, e Cry1Ca). Moléculas de ácido nucleico codificando os polipeptídeos também são providas. Métodos para utilizar os polipeptídeos e ácidos nucleicos da invenção para aumentar a resistência de plantas à predação por insetos são incluídos.

Polipeptídeos da Invenção

[0020] A presente invenção se refere ao polipeptídeos Cry derivados dos polipeptídeos Cry1 *Bacillus thuringiensis* (ex., Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ae, Cry1Ag, e Cry1Ca). Nas concretizações preferidas, os polipeptídeos derivados de Cry1 representam a região da δ -endotoxina madura e foram selecionados de um grupo consistindo nas SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28. Polipeptídeos da

invenção também incluem aqueles que são codificados de qualquer ácido nucleico derivado de Cry1 da invenção.

[0021] Em adição à sequência polipeptídica dos polipeptídeos derivados de Cry1, será reconhecido que os polipeptídeos da invenção também incluem variantes destes, incluindo, mas não limitado a, qualquer sequência substancialmente similar, qualquer fragmento, análogo, homólogo, alelo de ocorrência natural, ou mutante destes. Variantes incluídas pela invenção são polipeptídeos que são ao menos parcialmente ativos funcionalmente, ex., são capazes de demonstrar atividades funcionais associadas ao polipeptídeo Cry1 tipo selvagem. Tais atividades funcionais incluem, mas não são limitadas a, atividades biológicas, como a atividade inseticida; antigenicidade, ex., uma habilidade de ligar ou competir com um Cry1 tipo selvagem pela ligação a um anti-Cry1 anticorpo; imunogenicidade, ex. uma habilidade de gerar anticorpos que se ligam a um polipeptídeo Cry1 tipo selvagem. Em algumas concretizações, as variantes possuem ao menos uma atividade funcional que substancialmente similar ao seu polipeptídeo parental (ex., uma variante do polipeptídeo derivado de Cry1 possuirá ao menos uma atividade funcional que é substancialmente similar à do polipeptídeo derivado de Cry1 a qual é mais similar). Como utilizado aqui, a atividade funcional de uma variante será considerada "substancialmente similar" ao seu polipeptídeo parental se estiver dentro de um desvio padrão de seu parental.

[0022] Em uma concretização, polipeptídeos misturados de δ -endotoxina maduros que possuem ao menos uma atividade funcional de Cry1 (ex., atividade inseticida) e são ao menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 99.5% idênticos à sequência polipeptídica de qualquer um das SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 incluídos pela invenção.

[0023] Como utilizado aqui, onde uma sequência é definida como sendo "ao menos X% idêntica" a uma sequência de referência, ex., "um polipeptídeo ao menos 95% idêntico à SEQ ID NO: 2" deverá ser entendido que "X% idêntico" se refere à identidade percentual absoluta, exceto quando indicado de maneira diferente. O termo "identidade percentual absoluta" se refere à porcentagem de identidade de sequência determinada por contar amino ácidos ou nucleotídeos idênticos como um e qualquer substituição como zero, não importando a similaridade dos aminoácidos ou ácidos nucleicos não pareados. Em um típico alinhamento de sequência a "identidade percentual absoluta" de duas sequências é apresentada como uma porcentagem de "identidades" de amino ácidos ou ácidos nucleicos. Em casos onde um alinhamento ótimo de duas sequências requer a inserção de um intervalo em uma ou em ambas as sequências, um resíduo de amino ácido em uma sequência que se alinhe com um intervalo na outra sequência é contado como não pareamento para fim de determinação da identidade percentual. Intervalos podem ser internos ou externos, ex., uma truncagem. Identidade percentual absoluta pode ser prontamente determinada utilizando, por exemplo, o programa Clustal W, versão 1.8,

Junho de 1999, usando os parâmetros padrão (Thompson et al., 1994, *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680).

[0024] Em uma outra concretização, polipeptídeos de δ -endotoxina maduros que possuem ao menos uma atividade funcional de Cry1 (ex., atividade inseticida), são ao menos 99% ou 99,5% idênticos à sequência polipeptídica de qualquer uma das SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 e são codificados por um polinucleotídeo que hibridiza sob condições estringentes com ácidos nucleicos que codificam qualquer uma SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28.

[0025] Em uma concretização específica, um fragmento da invenção corresponde à extensão da pro-toxina processada. A toxina corresponde à porção N-terminal do polipeptídeo Cry1 de tamanho total. Em concretizações preferidas, o fragmento N-terminal de ~50kDa-75kDa corresponde à toxina. Em concretizações mais preferidas, o fragmento N-terminal de ~66kDa corresponde à toxina. Polipeptídeos que correspondem a este fragmento processado de Cry1 podem ser providos diretamente pelos métodos da presente invenção para evitar a necessidade do processamento da pró-toxina.

[0026] As sequências nucleotídicas ou polipeptídicas completas da pró-toxina são compostas dos domínios I, II, e III das regiões da toxina no contexto das regiões 5' ou N-terminal e 3' ou C-terminal da pró-toxina. Em alguns casos as regiões da pró-toxina e toxina são derivadas da mesma

molécula tipo Cry, como CR62 sendo totalmente derivado de Cry1Ca. Em outros casos a região 5' ou N-terminal é derivada principalmente de uma molécula enquanto a região C-terminal da pró-toxina é derivada de outra assim como com AR6, MR8' e derivativos em que a região 5' ou N-terminal é derivada predominantemente de Cry1Ab enquanto a região 3' ou C-terminal correspondente à região da pró-toxina é de Cry1Ca. É reconhecido que a região δ -endotoxina ativa das moléculas podem reter a exata atividade no contexto de um grupo diferente de sequências de pró-toxina derivadas de outras moléculas Cry1.

[0027] Em outra concretização específica, um fragmento da invenção corresponde ao domínio Cry1. Polipeptídeos maduros da toxina Cry1 possuem três domínios incluindo i) domínio I que é envolvido na inserção na membrana apical do intestino médio do inseto e afeta a função de canal de íon, ii) domínio II que é envolvido na ligação ao receptor na membrana celular epitelial do intestino médio do inseto, e iii) domínio III que é envolvido na função de canal de íon, ligação ao receptor, e inserção n membrana (Schnepf et al., 1998, *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 62:775-806).

[0028] Em outra concretização, polipeptídeos análogos são incluídos na invenção. Polipeptídeos análogos possuem resíduos que foram modificados, ex., por ligação covalente de qualquer tipo de molécula aos polipeptídeos derivados de Cry1. Por exemplo, mas não a modo de limitação, um polipeptídeo análogo da invenção pode ser modificado, ex., por glicosilação,

acetilação, peglação, fosforilação, amidação, derivatização por grupos protetores/bloqueadores conhecidos, clivagem proteolítica, ligação a um ligante celular ou outra proteína, etc. Um polipeptídeo análogo da invenção pode ser modificado por modificações químicas utilizando técnicas conhecidas por aqueles com habilidade na arte, incluindo, mas não limitado a clivagem químicas específicas, acetilação, formilação, síntese na presença de tunicamicina (um inibidor da glicosilação N-ligada e formação de ligações proteína-carboidrato N-glicosídicas), etc. Além do mais, um análogo de um polipeptídeo da invenção pode conter um ou mais amino ácidos não clássicos.

[0029] Métodos de produção dos polipeptídeos da invenção, ex., por meios recombinantes, são também providos.

[0030] Composições constituídas de um ou mais polipeptídeos da invenção são também incluídas. As composições da invenção podem compor posteriormente agentes adicionais incluindo, mas não limitado a, adjuvantes do tipo espalhante-adesivo, agentes estabilizadores, outros aditivos inseticidas, diluentes, agentes que otimizam as propriedades reológicas ou estabilidade da composição, como por exemplo, surfactantes, emulsificantes, dispersantes, e/ou polímeros.

Ácidos Nucleicos da Invenção

[0031] A presente invenção também se refere a moléculas de ácido nucleico derivadas de Cry1. Em concretizações

preferidas, as moléculas de ácido nucleico derivadas de Cry1 são selecionadas do grupo consistindo das SEQ ID NOS:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, e 27. Moléculas de ácido nucleico da invenção também incluem aquelas moléculas de ácido nucleico que codificam polipeptídeos derivados de Cry1 da invenção.

[0032] Em adição às moléculas de ácido nucleico derivadas de Cry1, irá ser notado que ácidos nucleicos da invenção também incluem variantes destes, incluindo, mas não limitado a qualquer sequência substancialmente similar, qualquer fragmento incluindo o fragmento tóxico, homólogo, alelo de ocorrência natural, ou mutante destes. Moléculas variantes de ácido nucleico incluídas na presente invenção codificam proteínas que são ao menos parcialmente ativas funcionalmente, ex., são capazes de demonstrar um ou mais atividades funcionais conhecidas associadas a um polipeptídeo Cry1 tipo selvagem. Tais atividades funcionais incluem, mas não são limitadas a, atividades biológicas, como atividade inseticida; antigenicidade, ex., uma habilidade de ligar ou competir com um polipeptídeo Cry1 tipo selvagem pela ligação a um anticorpo anti-Cry1; imunogenicidade, ex., uma habilidade de gerar anticorpo que se liga a um polipeptídeo Cry1 tipo selvagem. Em algumas concretizações, as variantes tem ao menos uma atividade funcional que é substancialmente similar à molécula de ácido nucleico parental (ex., uma variante de uma molécula de ácido nucleico derivada de Cry1 que irá codificar um polipeptídeo que possui ao menos uma atividade funcional que é substancialmente similar à do polipeptídeo codificado pela

molécula de ácido nucleico derivada de Cry1 que é mais similar. Como usado aqui, a atividade funcional de uma variante será considerada "substancialmente similar" ao seu polipeptídeo parental se estar dentro de um desvio padrão do parental.

[0033] Em uma concretização, moléculas de ácido nucleico misturadas que são ao menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 99.5% idênticas a qualquer uma das moléculas de ácido nucleico de SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 que são incluídas pela invenção. Em outra concretização, moléculas de ácido nucleico que são ao menos 99% ou 99,5% idênticas a qualquer uma das moléculas de ácido nucleico de SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 incluídas pela invenção.

[0034] Para determinar a identidade porcentual de duas moléculas de ácido nucleico, as sequências são alinhadas a fim de comparação ótima (ex., intervalos podem ser introduzidos na sequência de uma primeira molécula de ácido nucleico para um alinhamento ótimo com uma segunda molécula de ácido nucleico). Os nucleotídeos em posições nucleotídicas correspondentes são comparadas. Quando uma posição na primeira sequência é ocupada pelo mesmo nucleotídeo como a posição correspondente na segunda sequência, então as moléculas são idênticas nesta posição. A identidade porcentual entre as duas sequências é a função do número de posições idênticas partilhadas pelas sequências (ex., % de identidade = número de posições

idênticas sobrepostas/número total de posições x 100%). Em uma concretização, as duas sequências são de igual tamanho.

[0035] A determinação do percentual de identidade entre as sequências podem ser efetuada usando um algoritmo matemático. Um exemplo não limitante utilizado para a comparação de duas sequências é o algoritmo de Karlin e Altschul (Karlin e Altschul, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:2264-2268, modificado como em Karlin e Altschul, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:5873-5877). Tal algoritmo é incorporado nos programas NBLAST e XBLAST (Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403 e Altschul et al., 1997, *Nucleic Acid Res.* 25:3389-3402). Software para realizar análises de BLAST é disponível publicamente, ex., através do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI). Este algoritmo envolve primeiramente a identificação de pares de sequência de alta pontuação (HSPs) pela identificação de pequenas palavras de comprimento W na sequência isca, que tanto se iguala ou satisfaz alguma pontuação T, que tanto atinge ou satisfaz alguma pontuação limite de valor positivo T quando alinhado com uma palavra de mesmo tamanho em uma sequência da base de dados. T se refere ao limite de pontuação da palavra da vizinhança (Altschul et al., *supra*). Estes acertos de palavras da vizinhança atuam como ponto de partida para iniciar buscas para encontrar HSPs maiores que os contém. Os acertos de palavras são então extendidos em ambas as direções ao longo cada sequência até a pontuação cumulativa do alinhamento possa ser aumentada. Pontuações cumulativas são calculadas usando, para sequências nucleotídicas, os parâmetros M (pontuação de recompensa para

um par de resíduos pareados; sempre > 0) e N (pontuação de penalidade para resíduos não pareados; sempre < 0). Para sequências de amino ácidos, uma matriz de pontuação é usada para calcular a pontuação cumulativa. A extensão de acertos de palavra em cada direção é encerrada quando: a pontuação cumulativa do alinhamento cai pela quantidade X de seu valor máximo atingido; a pontuação cumulativa vai a zero ou abaixo, devido ao acúmulo de um ou mais alinhamentos de resíduos com pontuação negativa; ou o fim de qualquer uma das sequências é alcançado. Os parâmetros W , T , e X do algoritmo BLAST determinam a sensibilidade e velocidade do alinhamento. O programa BLASTN (para sequências nucleotídicas) usa como padrão um comprimento de palavra (W) de 11, uma expectativa (E) de 10, um ponto de corte de 100, $M = 5$, $N = -4$, e uma comparação de ambas as fitas. Para sequências de amino ácidos, o programa BLASTP usa como padrão um comprimento de palavra (W) de 3, uma expectativa (E) de 10, e a matriz e pontuação BLOSUM62 (veja Henikoff & Henikoff, 1989, PNAS, 89:10915).

[0036] O método de alinhamento Clustal V pode também ser usado para determinar a identidade porcentual (Higgins e Sharp, 1989, CABIOS. 5:151-153) e encontrado no programa Megalign de conjunto de bioinformática computacional da LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison, WI). Os "parâmetros padrão" são os parâmetros pré-configurados pelo fabricante do programa e para alinhamentos múltiplos estes correspondem a PENALIDADE DE INTERVALO=10 e PENALIDADE DE COMPRIMENTO DE INTERVALO=10, enquanto para alinhamentos em par, estes são "KTUPLE" 1, PENALIDADE DE INTERVALO=3, JANELA=5 e DIAGONAIS SALVAS=5. Após

alinhar as sequências, usando o Clustal V program, é possível obter uma "identidade porcentual" através da visualização

[0037] A identidade porcentual entre duas sequências pode ser determinada usando técnicas similares às descritas acima, permitindo ou não intervalos. No cálculo de identidade porcentual, tipicamente apenas os pareamentos exatos são contados.

[0038] Em outra concretização, moléculas de ácido nucleico incorporando quaisquer das moléculas de ácido nucleico derivadas de Cry1 aqui descritas são incluídas pela invenção. Moléculas de ácido nucleico que possuem ao menos uma atividade funcional de Cry1 (ex., atividade inseticida) são incluídas. A respeito disto, as sequências descritas que codificam a toxina podem ser combinadas com domínios de outras proteínas Cry para formar a proteína Cry completa.

[0039] Em uma concretização específica, a combinação corresponde a uma molécula de ácido nucleico que codifica a proteína Cry completa. A toxina corresponde à porção N-terminal do polipeptídeo Cry1 de comprimento total. Moléculas de ácido nucleico codificando o domínio I e moléculas de ácido nucleico codificando o domínio II podem então ser combinadas com as moléculas de ácido nucleico descritas para formar uma molécula de ácido nucleico codificando a proteína Cry1 madura.

[0040] Em outra concretização específica, um fragmento da invenção codifica uma proteína que corresponde a qualquer um dos domínios I, II, e III de uma proteína Cry1 madura.

[0041] Em outra concretização, uma molécula de ácido nucleico que hibridiza sob condições específicas a qualquer uma das SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 é incluída pela invenção. A expressão "condições estridente" se refere a condições de hibridização nas quais um ácido nucleico hibridizarão com o seu ácido nucleico alvo, tipicamente em uma mistura complexa de ácidos nucleicos, mas essencialmente a nenhuma outra sequência. Condições estridentes são dependentes de sequências e serão diferentes em circunstâncias diferentes. Ácidos nucleicos mais longos hibridizam especificamente em temperaturas maiores. Guias extensivos para a hibridização de ácidos nucleicos podem ser encontrado na arte (e.g., Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993)). Geralmente, condições altamente estridentes são selecionadas para estarem por volta de 5-10°C abaixo do ponto termal de derretimento (T_m) para ácidos nucleicos específicos em uma determinada força iônica e pH. Condições de baixa estringência são geralmente selecionadas para serem 15-30°C abaixo da T_m . A T_m é a temperatura (sob força iônica definida, pH, e concentração de ácidos nucleicos) na qual 50% das sondas complementares ao alvo hibridizam ao ácido nucleico alvo no equilíbrio (como os ácidos nucleicos alvo são encontrados em excesso, na T_m , 50% das sondas estão

ocupadas no equilíbrio). Condições de hibridização são tipicamente aquelas em que a concentração de sais é menor do que algo em torno de 1,0 M de íons de sódio, tipicamente uma concentração por volta de 0,01 a 1,0 M de íons de sódio ou outros sais) a um pH de 7,0 a 8,3 e a temperatura é ao menos algo em torno de 30°C para sondas pequenas (ex., 10 a 50 nucleotídeos) e ao menos por volta de 60°C para sondas grandes (ex., maiores do que 50 nucleotídeos). Condições estringentes também podem ser alcançadas com a adição de agentes desestabilizadores como formamida. Para hibridização seletiva ou específica, um sinal positivo é ao menos duas vezes o fundo, e preferencialmente 10 vezes a hibridização de fundo. Em uma concretização, condições estringentes incluem ao menos uma lavagem (usualmente 2) em 0,2X SSC a uma temperatura de ao menos em torno de 50°C, usualmente em torno de 55°C, e algumas vezes 60°C ou 65°C, por 20 minutos, ou condições substancialmente equivalentes. Em uma concretização específica, a molécula de ácido nucleico da invenção hibridiza especificamente seguindo ao menos uma lavagem em 0,2X SSC a 55°C por 20 minutos para um polinucleotídeo codificando o polipeptídeo de qualquer das SEQ ID NOS:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28. Em uma outra concretização, condições estringentes incluem hibridização em 6X cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) por volta de 45°C seguido de uma ou mais lavagens em 0,2X SSC, 0,1% SDS a 50-65°C.

[0042] A expressão "hibridiza especificamente" se refere à ligação, formação de duplex, ou hibridização de uma molécula somente a uma sequência nucleotídica em particular sob

condições estringentes de hibridização quando aquela sequência é encontrada em uma mistura complexa (ex., ADN ou ARN celular total ou de uma biblioteca).

[0043] Vetores contendo ácidos nucleicos da invenção são também incluídos. Células ou plantas contendo os vetores da invenção também são incluídos.

[0044] O termo "ácido nucleico" ou "molécula de ácido nucleico" aqui se refere ao polímero simples ou dupla-fita de bases deoxiribonucleotídicas ou ribonucleotídicas lidas a partir do 5' ao final 3'. Isto inclui ADN cromossômico, plasmídeos auto replicantes e ADN ou ARN que desempenha um papel principalmente estrutural. O termo "codificando" se refere a uma sequência polinucleotídica codificando um ou mais amino ácidos, O termo não requer um códon de início ou parada. Uma sequência de amino ácidos pode ser codificada em qualquer uma das seis fases de leitura diferentes providas pela sequência do polinucleotídeo e seu complemento.

[0045] Tabela 1 revela sequências derivadas de Cry1 e os números da identidade das sequência correspondentes.

Sequências derivadas de Cry1

[0046] Polipeptídeos e moléculas de ácido nucleico derivadas de Cry1 podem ser criados através da introdução de uma ou mais substituições, adições e/ou deleções na sequência nucleotídica de um Cry1 tipo selvagem (ex., Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad,

CryIAe, CryIAG, e CryICA) ou ácidos nucleicos relacionados, de maneira que um ou mais substituições de amino ácidos adições e/ou deleções são introduzidas na proteína codificada. Geralmente, sequências derivadas de CryI são criadas em ordem a acentuar características desejáveis ou reduzir uma característica indesejável de um polipeptídeo CryI tipo selvagem. Em uma concretização, polipeptídeos derivados de CryI melhoraram a atividade inseticida sobre os correspondentes CryI tipo selvagem incluindo, mas não limitado a, maior potência e/ou aumento da amplitude à praga de inseto. Em outra concretização, polipeptídeos derivados de CryI são melhor expressos que aqueles correspondentes ao CryI tipo selvagem no hospedeiro microbial ou hospedeiro vegetal incluindo, mas não limitado a, aumento da vida média, menos suscetível a degradação, e/ou transcrição ou tradução mais eficiente.

[0047] Em uma concretização, moléculas de ácido nucleico de CryIAb (SEQ ID NO: 33) ou CryICA (SEQ ID NO: 29, região codificando: 47-3616) derivadas de *Bacillus thuringiensis* foram usadas como moldes para criar fragmentos nucleotídicos misturados de *cryI*. Em uma outra concretização, variantes isoladas de um ciclo de alteração podem ser usadas como molde para ciclos de alterações adicionais (ex., AR6, CR62, ou MR8'). Em uma outra concretização, moldes codificando proteínas CryI a serem alteradas ou misturadas podem ser re-sintetizados para possuir uma sequência de ácidos nucleicos diferente para prover expressão melhorada em células para varredura e/ou finalidades de comercialização. Cada uma das

moléculas tipo Cry1 aqui descritas tanto derivadas apartir do 5' ou região N-terminal de Cry1Ab ou Cry1Ca contém a região 3' ou C-terminal da pró-toxina de Cry1Ca.

[0048] Alterações de sequência podem ser introduzidas por técnicas padrão com técnicas de evolução molecular direcionadas ex., métodos de mistura de ADN (veja ex., Christians et al., 1999, *Nature Biotechnology* 17:259-264; Crameri et al., 1998, *Nature*, 391:288-291; Crameri, et al., 1997, *Nature Biotechnology* 15:436-438; Crameri et al., 1996, *Nature Biotechnology* 14:315-319; Stemmer, 1994, *Nature* 370:389-391; Stemmer et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91:10747-10751; Patente Norte-Americana Nos. 5.605.793; 6.117.679; 6.132.970; 5.939.250; 5.965.408; 6.171.820; Publicação Internacional Nos. WO 95/22625; WO 97/0078; WO 97/35966; WO 98/27230; WO 00/42651; e WO 01/75767); mutagênese direcionada posicional (see ex., Kunkel, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82:488-492; Oliphant et al., 1986, *Gene* 44:177-183); mutagênese direcionada por oligonucleotídeo (veja ex., Reidhaar-Olson et al., 1988, *Science* 241:53-57); mutagênese química (veja ex., Eckert et al., 1987, *Mutat. Res.* 178:1-10); PCR sujeito a erro (veja ex., Caldwell & Joyce, 1992, *PCR Methods Applic.* 2:28-33); e mutagênese por cassete (veja ex., Arkin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1992, 89:7871-7815); (veja geralmente, ex., Arnold, 1993, *Curr. Opinion Biotechnol.* 4:450-455; Ling et al., 1997, *Anal. Biochem.*, 254(2):157-78; Dale et al., 1996, *Methods Mol. Biol.* 57:369-74; Smith, 1985, *Ann. Rev. Genet.* 19:423-462; Botstein et al., 1985, *Science*, 229:1193-1201; Carter, 1986, *Biochem. J.* 237:1-7; Kramer et

al., 1984, *Cell* 38:879-887; Wells *et al.*, 1985, *Gene* 34:315-323; Minshull *et al.*, 1999, *Current Opinion in Chemical Biology* 3:284-290).

[0049] Em uma concretização, mistura de ADN é usada para criar moléculas de ácido nucleico derivadas de Cry1. Mistura de ADN pode ser realizada *in vitro*, *in vivo*, *in silico*, ou uma combinação destes. Métodos de recombinação *in silico* podem ser realizados de modo que algoritmos genéticos são usados em um computador para recombinar as cadeias das sequências que correspondem a ácidos nucleicos homólogos (ou até não homólogos). Cadeias resultantes de sequência recombinadas são opcionalmente convertidas em ácidos nucleicos pela síntese de ácidos nucleicos que correspondem às sequências recombinadas, ex., em conjunto com técnicas de montagem gênica por síntese de oligonucleotídeos. Esta abordagem pode gerar alterações aleatórias, parcialmente aleatórias ou projetadas. Muitos detalhes a respeito da recombinação *in silico*, incluindo o uso de algoritmos genéticos, operadores genéticos e semelhantes em sistemas de computadores, combinados com a geração de ácidos nucleicos correspondentes assim como combinações de ácidos nucleicos projetados (ex., baseadas em seleção de sítio de "cross-over") assim como métodos de recombinação projetada, pseudo-aleatória ou aleatória são descritos na arte (veja ex., Publicação Internacional Nos. WO 00/42560 e WO 00/42559).

[0050] Em uma outra concretização, mutagênese direcionada é utilizada para criar moléculas de ácido nucleico derivadas de Cry1 através da escolha de sequências nucleotídicas

particulares ou posições de Cry1 tipo selvagem ou de moléculas de ácido nucleico relacionadas para alteração. Tais mutações direcionadas podem ser introduzidas em qualquer posição no ácido nucleico. Por exemplo, podem ser feitas substituições nucleotídicas levando a substituições de amino ácidos em resíduos de amino ácidos "não essenciais" ou "essenciais". Um resíduo de amino ácido "não-essencial" é um resíduo que pode ser alterado a partir da sequência tipo selvagem sem alterar a atividade biológica do polipeptídeo, enquanto um resíduo de amino ácido "essencial" é requerido para ao menos uma atividade biológica do polipeptídeo. Por exemplo, resíduos de aminoácidos que são não conservados ou somente semi-conservados entre homólogos de várias espécies podem ser não essenciais para a atividade. Alternativamente, resíduos de aminoácidos que são conservados entre os homólogos de várias espécies podem ser essenciais para a atividade.

[0051] Tais mutações direcionadas podem ser conservativas ou não conservativas. Uma "substituição de amino ácidos não conservativa" é uma em que o resíduo de amino ácido é substituído por um resíduo de amino ácido possuindo uma cadeia lateral dissimilar. Famílias de resíduos de amino ácidos possuindo uma cadeia lateral similar foram definidas na arte. Estas famílias incluem amino ácidos com cadeias laterais básicas (ex., lisina, arginina, histidina), cadeias laterais acídicas (ex., ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina, glutamina), cadeias laterais polares não carregadas (ex., glicina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais apolares (ex., alanina, valina, leucina, isoleucina,

prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais β -ramificadas (ex., treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (ex., tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina).

[0052] Alternativamente ou em adição às substituições de resíduo não-conservativas, tais mutações direcionadas podem ser conservativas. Uma "substituição de amino ácido conservativa" é uma em que o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido possuindo uma cadeia lateral similar. Mutagênese seguinte, a proteína codificada pode ser expressa de modo recombinante e a atividade da proteína pode ser determinada.

[0053] Em uma outra concretização, mutagênese aleatória é usada para criar nucleotídeos derivados de Cry1. Mutações podem ser introduzidas aleatoriamente ao longo de toda ou parte da sequência codificante (ex., por mutagênese saturante ou PCR sujeito a erro). Em certas concretizações, sequências nucleotídicas codificando outros peptídeos relacionados que possuem domínios similares, motivos estruturais, sítios ativos, ou alinham com uma porção da Cry1 da invenção com não pareamentos ou pareamentos imperfeitos, podem ser usados no processo de mutagênese para gerar diversidade de sequências.

[0054] Deve ser entendido que para cada passo da mutagênese em alguma das técnicas mencionadas acima, um número de ciclos iterativos de quaisquer ou todos os passos podem ser realizados para otimizar a diversidade de sequências. Os

métodos descritos acima podem ser usados em combinação em qualquer ordem desejada. Em muitos casos, os métodos resultam em um conjunto de sequências de ácido nucleico alteradas ou um conjunto de células hospedeiras recombinantes contendo sequências de ácido nucleico alteradas. As sequências de ácido nucleico alteradas ou células hospedeiras expressando uma sequência de ácido nucleico alterada com as características desejadas podem ser identificadas por varredura com uma ou mais análises conhecidas na arte. As análises podem ser realizadas sob condições que selecionam por polipeptídeos possuindo as características físicas ou químicas desejadas. As alterações na sequência de ácido nucleico podem ser determinadas através do sequenciamento da molécula de ácido nucleico codificando o polipeptídeo alterado em suas variantes.

[0055] Adicionalmente, moléculas de ácido nucleico derivadas de Cry1 podem ser otimizadas por códon, tanto totalmente ou em parte. Porque qualquer um amino ácido (exceto por metionina e triptofano) é codificado por um número de códons (Tabela 2), a sequência da molécula de ácido nucleico pode ser modificada sem alterar o amino ácido codificado. Otimização de códon é quando um ou mais códons são alterados ao nível de ácido nucleico, de tal modo que aminoácidos não são alterados, mas a expressão em um organismo em particular é aumentada. Aqueles possuindo uma habilidade básica na arte irão reconhecer que tabelas de códons e outras referências proveem informação preferencial para uma vasta amplitude de organismos são disponíveis na arte.

Métodos de Análise da Atividade Inseticida

[0056] Como usado aqui, o termo "atividade inseticida" se refere à habilidade de um polipeptídeo de diminuir ou inibir a alimentação do inseto e/ou aumentar a mortalidade do inseto na ingestão do polipeptídeo. Embora qualquer inseto possa ser afetado, preferencialmente insetos da ordem *Lepidopteran* incluindo *Helicoverpa*, *Heliothis*, ou *Spodoptera* são afetados.

[0057] Uma variedade de análises podem ser usadas para determinar quanto um polipeptídeo em particular da invenção tem atividade inseticida e, se tiver, em qual grau. Geralmente, uma praga de inseto é provida com um polipeptídeo da invenção em qualquer forma que possa ser ingerido. A reação da praga de inseto à ingestão do polipeptídeo da invenção é observada (ex., por algo em torno de um a três dias). Uma diminuição ou inibição da alimentação e/ou um aumento da mortalidade da praga de inseto após a ingestão do polipeptídeo da invenção são indicadores da atividade inseticida. Um polipeptídeo da invenção com atividade inseticida desconhecida deve ser comparado a um controle positivo e/ou negativo para acessar mais acuradamente o resultado da análise.

[0058] Em uma concretização, um polipeptídeo da invenção é purificado (tanto nas formas solúvel ou cristalina) e adicionado à dieta do inseto.

[0059] Em uma outra concretização, um polipeptídeo da invenção é expresso em um micróbio recombinante (ex., *E.*

Coli). O micróbio recombinante é usado diretamente na alimentação da praga de inseto (veja Moellenbeck et al., 2001, *Nat. Biotechnol.* 19:668).

[0060] Em uma outra concretização, o polipeptídeo da invenção é expresso em uma planta e a planta é usada na alimentação da praga de inseto. Seguindo o período de incubação, a atividade alimentar da praga de inseto pode ser determinada por observação visual (ex., da fração aproximada da área foliar restante) ou pelo registro em vídeo (ex., número de pixels na área foliar restante) das partes da planta que deveriam normalmente ter sido comidas pela praga de inseto. Em uma concretização específica, a expressão do polipeptídeo da invenção é transiente. Em tais concretizações, um ácido nucleico codificando um polipeptídeo da invenção é clonado em um vetor de expressão em plantas e transfetado em *Agrobacterium tumefaciens*. A cultura de bactérias transformadas é co-cultivada com uma folha de *N. benthamiana* e, usando infiltração forçada, a folha expressa o polipeptídeo da invenção. Entretanto, a expressão do polipeptídeo é variável entre co-culturas de folhas. Em outra concretização específica, a expressão do polipeptídeo da invenção na planta é estável. Em tais concretizações, uma planta transgênica é construída de forma a produzir um polipeptídeo da invenção.

[0061] Em uma outra concretização, a atividade inseticida de um polipeptídeo da invenção pode ser analisada através da medição da morte celular e/ou crescimento celular usando células cultivadas. Tais análises tipicamente envolvem o uso

de células de inseto cultivadas que são suscetíveis à toxina em particular utilizada na varredura, ou células que expressam um receptor para a toxina em particular, tanto naturalmente quanto como resultado da expressão de um gene heterólogo. Portanto, em adição às células de insetos, células de mamíferos, bactérias, e leveduras estão entre aquelas úteis nos ensaios *in vitro*. Bioensaios *in vitro* que medem a toxicidade contra células cultivadas são descritos na arte (ex., Johnson, 1994, *J. Invertebr. Pathol.* 63:123-129).

[0062] Em um outra concretização, a atividade inseticida de um polipeptídeo da invenção pode ser testada pela medição da formação de poros nas vesículas membranares do epitélio do intestino médio derivadas de inseto (Juttner e Ebel, 1998, *Biochim. Biophys. Acta* 1370:51-63.; English et al., 1991, *Insect Biochem.* 21:177-184). Tal ensaio pode constituir a liberação condicional da toxina de um substrato ativado por ligante do lúmen das vesículas membranares. Isto requer que o ligante esteja no lado de fora da vesícula. Alternativamente o cenário reverso pode ser utilizado onde o ligante está no lúmen da vesícula e o substrato pronto para ser ativado está localizado no lado de fora da vesícula. Quanto maior a atividade da toxina, maior o número ou tamanho dos poros formados.

Métodos de Aumentar a Resistência a Insetos em Plantas

[0063] A presente invenção disponibiliza métodos de aumentar a resistência da planta a pragas de insetos incluindo, mas não

limitado a, *Helicoverpa ssp.* (ex., *Helicoverpa Zea* e *Heliothis virescens*) e/ou *Spodoptera ssp.* (ex., *Spodoptera exigua*, *Spodoptera frugiperda*) através do uso de polipeptídeos inseticidas derivados de Cry1. Qualquer método conhecido na arte pode ser usado para causar a ingestão pela praga de inseto de um ou mais polipeptídeos da invenção durante o curso da alimentação na planta. Como tal, a praga de inseto irá ingerir quantidades inseticidas de um ou mais polipeptídeos da invenção e pode descontinuar a alimentação na planta. Em algumas concretizações, a praga de inseto é morta pela ingestão de um ou mais polipeptídeos da invenção. Em outras concretizações, as pragas de insetos são inibidas ou desencorajadas a alimentar-se da planta sem serem mortas.

[0064] Em uma concretização, plantas transgênicas podem ser produzidas para expressar um ou mais polipeptídeos da invenção. A planta transgênica pode expressar um ou mais polipeptídeos da invenção em todos os tecidos (ex., expressão global). Alternativamente, um ou mais polipeptídeos da invenção podem ser expressos em somente um subconjunto de tecidos (ex., expressão tecido específica), preferencialmente naqueles tecidos consumidos pela praga de inseto. Polipeptídeos da invenção podem ser expressos constitutivamente na planta ou estar sob controle de um promotor induzível. Polipeptídeos da invenção podem ser expressos no citosol da planta ou no cloroplasto da planta, tanto por endereçamento de proteínas ou por transformação do genoma do cloroplasto.

[0065] Em uma outra concretização, uma composição constituindo um ou mais polipeptídeos da invenção pode ser aplicada externamente a uma planta suscetível à praga de inseto. Aplicação externa da composição inclui a aplicação direta à planta, tanto em toda ou em parte, e/ou aplicação indireta, ex., ao ambiente cercando a planta assim como o solo. A composição pode ser aplicada por qualquer método conhecido na arte incluindo, mas não limitado a, borrifamento, pulverização, aspersão, ou semelhantes. Em geral, a composição pode ser aplicada a qualquer tempo durante o crescimento da planta. Alguém versado na arte pode usar métodos conhecidos na arte para determinar empiricamente o tempo ótimo para a administração da composição. Fatores que afetam o tempo ótimo de administração incluem, mas não estão limitados a, o tipo de planta suscetível, o tipo de praga de inseto, quais um ou mais polipeptídeos da invenção são administrados na composição.

[0066] A composição constituindo um ou mais polipeptídeos da invenção pode ser polipeptídeos substancialmente purificados, uma suspensão celular, um precipitado celular, um sobrenadante celular, um extrato celular, ou um complexo espora-cristal de células de *Bacillus thuringiensis*. A composição constituindo um ou mais polipeptídeos da invenção pode estar na forma de uma solução, uma emulsão, uma suspensão, ou um pó. Formulações líquidas podem ser baseadamente aquosas ou não aquosas e podem ser providas como espumas, géis, suspensões, concentrados emulsaíveis, ou semelhantes. As formulações podem incluir agentes na adição de um ou mais polipeptídeos da invenção. Por exemplo, composições podem posteriormente consistir de

adjuvantes do tipo espalhante-adesivo, diluentes, agentes que otimizam as propriedades reológicas ou estabilidade da composição, como, por exemplo, surfactantes, emulsificadores, dispersantes, ou polímeros.

[0067] Em uma outra concretização, hospedeiros recombinantes que expressam um ou mais polipeptídeos da invenção são aplicados na ou na proximidade da planta suscetível ao ataque por uma praga de inseto. Os hospedeiros recombinantes incluem, mas não são limitados a, hospedeiros microbiais e vírus de insetos que foram transformados com e expressam uma ou mais moléculas de ácido nucleico (e portanto polipeptídeos) da invenção. Em algumas concretizações, o hospedeiro recombinante secreta o polipeptídeo da invenção no ambiente que o circunda de modo a fazer contato com a praga de inseto.

Expressão Recombinante

[0068] Moléculas de ácido nucleico e polipeptídeos da invenção podem ser recombinante expressas usando técnicas padrão de ADN recombinante e técnicas de clonagem molecular que são bem conhecidas na arte (ex., Sambrook, Fritsch, e Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1989). Adicionalmente, técnicas de ADN recombinante podem ser usadas para criar construções de ácidos nucleicos apropriadas para o uso na produção de plantas transgênicas.

[0069] De acordo, um aspecto da invenção diz respeito aos vetores, preferencialmente vetores de expressão, consistindo de uma molécula de ácido nucleico da invenção, ou uma variante destes. Como usado aqui, o termo "vetor" se refere a um polinucleotídeo capaz de transportar um outro ácido nucleico ao qual este foi ligado. Um tipo de vetor é um "plasmídeo", que se refere a uma volta de ADN dupla fita circular dentro do qual segmentos de ADN adicionais podem ser introduzidos. Um outro tipo de vetor é um vetor viral, onde segmentos de ADN adicionais podem ser introduzidos no genoma viral.

[0070] Certos vetores são capazes de se replicarem de forma autônoma em um célula hospedeira na qual estes são introduzidos (ex., vetores bacterianos possuindo um origem de replicação bacteriana e vetores epissomais). Outros vetores (ex., vetores não epissomais) são integrados no genoma da célula hospedeira na introdução na célula hospedeira, e por meio disto são replicados junto com o genoma do hospedeiro. Em geral, vetores de expressão de utilidade em técnicas de ADN recombinante estão frequentemente na forma de plasmídeos (vetores). Entretanto, a invenção é planejada para incluir tais outras formas de vetores de expressão, como os vetores virais (ex., retrovírus defectivos em replicação).

[0071] Os vetores de expressão recombinantes da invenção compreendem uma molécula de ácido nucleico da invenção na forma apropriada para a expressão da molécula de ácido nucleico na célula hospedeira. Isto significa que os vetores de expressão recombinantes incluem um ou mais sequências

regulatórias, selecionadas na base das células hospedeiras para serem usadas para expressão, que são operacionalmente associadas com o polinucleotídeo a ser expresso. Dentro de um vetor de expressão recombinante "associado operacionalmente" tem o intuito de significar que a sequência nucleotídica de interesse é ligada à sequência (s) regulatória em uma maneira que permita a expressão da sequência nucleotídica (ex., em um sistema de transcrição/tradução *in vitro* ou em uma célula hospedeira quando o vetor é introduzido na célula hospedeira). O termo "sequência regulatória" tem o intuito de incluir promotores, intensificadores e outros elementos de controle da expressão (ex., sinais de poliadenilação). Tais sequências regulatórias são descritas na arte (ex., Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, 1990, Academic Press, San Diego, CA). Sequências regulatórias incluem aquelas que dirigem a expressão constitutiva de uma sequência nucleotídica em muitos tipos de células hospedeiras e aquelas que dirigem a expressão de uma sequência nucleotídica somente em certas células hospedeiras (ex., sequências regulatórias tecido-específicas). Será apreciado por aqueles versados na arte que o projeto do vetor de expressão pode depender de fatores tais como a escolha da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão da proteína desejada, a área do organismo no qual a expressão é desejada, etc. Os vetores de expressão da invenção podem ser introduzidos em células hospedeiras para por meio disto produzir proteínas ou peptídeos, incluindo proteínas de fusão ou peptídeos, codificados por moléculas de ácido nucleico como descrito aqui.

[0072] Em algumas concretizações, ácidos nucleicos isolados que servem como promotores ou elementos intensificadores podem ser introduzidos em uma posição apropriada (geralmente à montante) de uma forma não-heteróloga de um polinucleotídeo da presente invenção de modo a induzir ou reprimir a expressão de um polinucleotídeo da presente invenção. Por exemplo, promotores endógenos podem ser alterados *in vitro* por mutação, deleção e/ou substituição (veja, Patente US No. 5.565.350; Pedido de Patente Internacional No. PCT/US93/03868), ou promotores isolados podem ser introduzidos em uma célula vegetal em apropriadas orientação e distância de um gene cognato de um polinucleotídeo da presente invenção de modo a controlar a expressão do gene. Expressão gênica pode ser modulada sob condições apropriadas para o crescimento da planta de modo a alterar a concentração total e/ou alterar a composição dos polipeptídeos da presente invenção nas células da planta.

[0073] Se a expressão do polipeptídeo em um sistema eucariótico é desejada, é geralmente desejável incluir uma região de poliadenilação no extremidade 3' de uma região codificante do polinucleotídeo. A região de poliadenilação para expressão em plantas pode ser derivada de um gene natural, de uma variedade de genes de planta, o do T-DNA de *Agrobacterium*. A sequência da extremidade 3' a ser adicionada pode ser derivada de, por exemplo, os genes nopalina sintase e octopina sintase, ou alternativamente de um outro gene de planta, ou menos preferivelmente de qualquer outro gene eucariótico.

[0074] Os vetores de expressão recombinantes da invenção podem ser projetados para a expressão de um polipeptídeo da invenção em células procarióticas (ex., *Enterobacteriaceae*, como *Escherichia*; *Bacillaceae*; *Rhizobaceae*, como *Rhizobium* e *Rhizobacter*; *Spirillaceae*, como fotobactéria; *Zymomonas*; *Serratia*; *Aeromonas*; *Vibrio*; *Desulfovibrio*; *Spirillum*; *Lactobacillaceae*; *Pseudomonadaceae*, como *Pseudomonas* e *Acetobacter*; *Azotobacteraceae* e *Nitrobacteraceae*) ou eucarióticas (ex., células de insetos usando vetores de expressão de baculovírus, células de levedura, células de planta, ou células de mamíferos) (veja Goeddel, *supra*. Para uma discussão de células hospedeiras). Alternativamente, o vetor de expressão recombinante pode ser transcrito e traduzido *in vitro*, por exemplo usando sequências regulatórias do promotor T7 e polimerase T7.

[0075] Expressão de proteínas em procariotos é mais comumente conduzida em *E. coli* com vetores contendo promotores constitutivos ou induzíveis direcionando a expressão de tanto proteínas de fusão quanto proteínas que não são de fusão. Vetores de fusão adicionam um número de amino ácidos à proteínas codificadas nestes, usualmente ao término amino da proteína recombinante. Tais vetores de fusão tipicamente servem ao menos a três propósitos: 1) aumentar a expressão da proteína recombinante 2) aumentar a solubilidade da proteína recombinante; e/ou 3) auxiliar na purificação da proteína recombinante por atuar como um ligante na purificação por afinidade. Frequentemente, em vetores de expressão de fusão, um sítio de clivagem proteolítica é introduzido na junção da

porção de fusão com a proteína recombinante para permitir a separação da proteína recombinante da porção de fusão subsequente à purificação da proteína de fusão. Tais enzimas, e suas sequências de reconhecimento cognatas, incluem o Fator Xa, trombina e enteroquinase. Vetores de expressão de fusão típicos incluem pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith e Johnson, 1988, *Gene* 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) e pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) e pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que fusionam glutathione-S-transferase (GST), proteína ligante a maltose E, ou proteína A, respectivamente a proteína alvo recombinante.

[0076] Em uma outra concretização, o vetor de expressão é um vetor de expressão de levedura. Exemplos de vetores para a expressão em levedura *S. cerevisiae* incluem pYepSec1 (Baldari et al., 1987, *EMBO J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan e Herskowitz, 1982, *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al., 1987, *Gene* 54:113-123), pYES2 (Invitrogen Corp., San Diego, CA), e pPicZ (Invitrogen Corp., San Diego, CA).

[0077] Alternativamente, o vetor de expressão é um vetor de expressão de baculovírus. Vetores de baculovírus disponíveis para a expressão de proteínas em cultivo de células de insetos (ex., células Sf 9) incluem as séries pAc (Smith et al., 1983, *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) e as séries pVL (Lucklow e Summers, 1989, *Virology* 170:31-39).

[0078] Ainda em uma outra concretização, um ácido nucleico da invenção é expresso em células de planta usando um vetor de

expressão de planta incluindo, mas não limitado a, vetores de expressão de vírus do mosaico do tabaco e vírus da batata.

[0079] Outros sistemas de expressão apropriados para ambas as células procarióticas e eucarióticas são conhecidas na arte (veja, ex., capítulos 16 e 17 de Sambrook et al. 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

[0080] Um número de promotores podem ser usados na prática da invenção. Os promotores podem ser selecionados baseado no resultado desejado. Os ácidos nucleicos podem ser combinados com promotores constitutivos, tecido-específicos, induzíveis ou outros promotores para a expressão no organismo hospedeiro.

[0081] Um "promotor tecido-específico" pode direcionar a expressão de ácidos nucleicos da presente invenção em um tecido específico, órgão ou tipo celular. Promotores tecido-específicos podem ser induzíveis. Similarmente, promotores tecido-específicos podem promover a transcrição somente dentro de certa janela de tempo ou estágio de desenvolvimento no tecido. Outros promotores tecido específicos podem ser ativos ao longo do ciclo de vida de um tecido em particular. Alguém com habilidade básica na arte irá reconhecer que um promotor tecido-específico pode dirigir a expressão de sequências operacionalmente ligadas em outros tecidos além do tecido alvo. Então, como usado aqui, um promotor tecido-específico é aquele que dirige expressão preferencialmente no tecido alvo ou tipo celular, mas pode também levar a alguma expressão em

outros tecidos também. Um número de promotores tecido-específicos pode ser usado na presente invenção. Com o promotor apropriado, qualquer órgão pode ser atingido, como os órgãos/estruturas vegetativos da parte aérea (ex., folhas, caules e tubérculos), raízes, flores e órgãos/estruturas florais (ex., brácteas, sépalas, pétalas, estames, carpelos, anteras e óvulos), semente (incluindo embrião, endosperma, e casca da semente) e fruto. Por exemplo, promotores que direcionam a expressão de ácidos nucleicos em folhas, raízes ou flores são úteis para aumentar a resistência a pragas que infectam aqueles órgãos. Para a expressão de um polinucleotídeo da presente invenção nos órgãos vegetativos aéreos de uma planta, promotores específicos de órgãos fotossintetizantes, como o promotor *RBCS* (Khoudi *et al.*, *Gene* 197:343, 1997), podem ser usados. A expressão específica de raiz de polinucleotídeos da presente invenção pode ser realizada sob o controle de um promotor raiz-específico, como, por exemplo, o promotor do gene *ANR1* (Zhang e Forde, *Science*, 279:407, 1998). Outros promotores exemplares incluem o gene glutamina sintetase raiz-específico de soja (Hirel *et al.*, 1992, *Plant Molecular Biology* 20:207-218) e o elemento controlador raiz-específico do gene GRP 1.8 de feijão (Keller *et al.*, 1991, *The Plant Cell* 3:1051-1061).

[0082] Um "promotor constitutivo" é definido como um promotor que irá direcionar a expressão de um gene em todos os tecidos e é ativo sob a maioria das condições ambientais e estados de desenvolvimento ou diferenciação celular. Exemplos de promotores constitutivos incluem a região de iniciação

transcricional 35S do vírus do mosaico de couve-flor (CaMV), o promotor 1' ou 2' derivados do T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens*, e outras regiões de iniciação transcricional de vários genes de planta conhecidos por aqueles com habilidade básica na arte. Tais genes incluem por exemplo, *ACT11* de *Arabidopsis* (Huang et al. 1996, *Plant Mol. Biol.* 33:125-139), *Cat3* de *Arabidopsis* (GenBank Accession No. U43147, Zhong et al., 1996, *Mol. Gen. Genet.* 251:196-203), o gene codificando a dessaturase de proteínas carreadoras de estearoil-acil de *Brassica napus* (Genbank Accession No. X74782, Solocombe et al. 1994, *Plant Physiol.* 104:1167-1176), *Gpc1* de milho (GenBank Accession No. X15596, Martinez et al., 1989, *J. Mol. Biol.* 208:551-565), e *Gpc2* de milho (GenBank Accession No. U45855, Manjunath et al., 1997, *Plant Mol. Biol.* 33:97-112). Qualquer promotor forte e constitutivo, como o promotor CaMV 35S, pode ser usado para a expressão de polinucleotídeos da presente invenção por toda a planta.

[0083] O termo "promotor induzível" se refere a um promotor que está sob preciso controle ambiental e de desenvolvimento. Exemplos de condições ambientais que podem afetar a transcrição por promotores induzíveis incluem condições anaeróbicas, temperatura elevada, a presença de luz, ou borrifamento com químicos/hormônios.

[0084] Promotores constitutivos apropriados para o uso em uma célula hospedeira de planta incluem, por exemplo, o promotor *cerne* do promotor *Rsyn7* e outros promotores constitutivos relacionados (Publicação Internacional No. WO

99/43838 e Patente U.S. No. 6.072.050); o promotor cerne CaMV 35S (Odell *et al.*, 1985, *Nature* 313:810-812); actina de arroz (McElroy *et al.*, 1990, *Plant Cell* 2:163-171); ubiquitina (Christensen *et al.*, 1989, *Plant Mol. Biol.* 12:619-632 e Christensen *et al.*, 1992, *Plant Mol. Biol.* 18:675-689); pEMU (Last *et al.*, 1991, *Theor. Appl. Genet.* 81:581-588); MAS (Velten *et al.*, 1984, *EMBO J.* 3:2723-2730); promotor ALS (Patente U.S. No. 5.659.026), e semelhantes (e.g., Patentes U.S. Nos. 5.608.149; 5.608.144; 5.604.121; 5.569.597; 5.466.785; 5.399.680; 5.268.463; 5.608.142; e 6.177.611).

[0085] Um outro aspecto da invenção se refere às células hospedeiras nas quais um vetor de expressão recombinante foi introduzido. Os termos "célula hospedeira" e "célula hospedeira recombinante" são usados intercambiavelmente aqui. É entendido que tais termos se referem não apenas à célula em particular, mas à progênie ou progênie potencial de tal célula. Porque certas modificações podem ocorrer em gerações sucessivas devido a tanto mutações ou influências ambientais, tal progênie pode não ser, de fato, idêntica à célula parental, mas é ainda incluída dentro do escopo do termo usado aqui.

[0086] De acordo, a presente invenção provê uma célula hospedeira contendo um vetor de expressão constituindo um ácido nucleico da invenção, ou uma variação deste. Uma célula hospedeira pode ser qualquer procariótica (ex., *E. coli*, *Bacillus thuringiensis* or other *Bacillus spp.*) ou eucariótica (ex., células de inseto, levedura ou células de planta). A

invenção também provê um método para expressar um ácido nucleico da invenção e, portanto, a fabricação do polipeptídeo codificado constitui as etapas de i) cultivo da célula constituindo a molécula de ácido nucleico da invenção sob condições que permitem a produção da polipeptídeo codificado; e ii) isolamento do polipeptídeo expresso.

[0087] ADN do vetor pode ser introduzido em células procarióticas ou eucarióticas via técnicas de transformação ou transfecção convencionais. Como usado aqui, os termos "transformação" e "transfecção" são usados com o intuito de se referir a uma variedade de técnicas reconhecidas na arte para introduzir moléculas de ácido nucleico exógenas em uma célula hospedeira, incluindo co-precipitação com fosfato de cálcio ou cloreto de cálcio, transfecção mediada por DEAE-dextran, lipofecção (transfecção de lipossoma), ou eletroporação. Métodos apropriados para transformação e transfecção de células hospedeiras podem ser encontrados na arte (e.g., Sambrook, *et al. supra.*).

[0088] Adicionalmente, é possível endereçar a expressão de um ADN em particular para uma localização particular da planta. Por exemplo, os genes na planta codificando a subunidade pequena da RUBISCO (SSU) são com frequência fortemente expressos, regulados por luz e algumas vezes mostram especificidade de tecido. Essas propriedades de expressão se devem em grande parte às sequências promotoras destes genes. É possível usar os promotores de SSU para expressar genes heterólogos em plantas transformadas.

Tipicamente, uma planta irá conter múltiplos genes SSU, e os níveis de expressão e especificidade tecidual de diferentes genes SSU irá ser diferente. As proteínas SSU são codificadas no núcleo e sintetizadas no citoplasma como precursores que contém uma extensão N-terminal conhecida como peptídeo de trânsito cloroplastidial (CTP). O CTP direciona o precursor para o cloroplasto e promove a incorporação da proteína SSU no cloroplasto. Neste processo, o CTP é clivado da proteína SSU. Estas sequências CTP têm sido usadas para direcionar proteínas heterólogas para cloroplastos de plantas transformadas.

[0089] Os promotores de SSU poderiam ter diversas vantagens para a expressão de genes heterólogos em plantas. Alguns promotores de SSU são altissimamente expressos e poderiam originar níveis de expressão tão ou mais altos do que aqueles observados com outros promotores. Por causa da distribuição tecidual divergente da expressão obtida apartir dos promotores de SSU, para o controle de algumas pragas de insetos, poderia ser vantajoso direcionar a expressão de proteínas cristalinas para aquelas células nas quais SSU é mais altamente expresso.

[0090] Por exemplo, embora relativamente constitutivo, na folha, o promotor CaMV35S é mais altamente expresso em tecidos vasculares do que em outras partes da folha, enquanto a maioria dos promotores de SSU são mais altamente expressos nas células do mesófilo da folha. Alguns promotores de SSU são também mais altamente tecido específicos, então seria possível utilizar um promotor de SSU específico para expressar uma proteína da presente invenção em somente um subconjunto de

tecidos da planta, se por exemplo a expressão de tal proteína em certas células for deletéria para aquelas células. Por exemplo, para o controle do besouro de batata do Colorado em batata, poderia ser vantajoso usar os promotores SSU para direcionar a expressão de proteínas cristalinas para as folhas, mas não para os tubérculos comestíveis.

[0091] Utilização das sequências CTP de SSU para localizar proteínas cristalinas para os cloroplastos também poderia ser vantajoso. A localização das proteínas cristalinas de *B. Thuringiensis* para o cloroplasto poderia protegê-las de proteases encontradas no citoplasma. Isto poderia estabilizar as proteínas e levar a níveis mais altos de acúmulo da toxina ativa. Genes cry contendo o CTP podem ser usados em combinação com o promotor de SSU ou com outros promotores como o CaMV35S.

[0092] Pode ser também vantajoso para alguns propósitos direcionar as proteínas Cry para outros compartimentos da célula da planta, como isto pode resultar em exposição reduzida das proteínas a proteases citoplasmáticas, por vez levando a um maior acúmulo da proteína, o que poderia permitir uma atividade inseticida aumentada. Localização extracelular poderia levar a uma exposição aumentada de alguns insetos às proteínas Cry, o que poderia também levar a uma atividade inseticida aumentada. Se uma proteína Cry em particular se mostrar danosa ao funcionamento da célula vegetal, então a localização para compartimentos não citoplasmáticos poderia proteger estas células da proteína.

[0093] De modo a exemplificar, em plantas assim como em outros eucariotos, proteínas que devem ser localizadas tanto extracelularmente ou em vários compartimentos específicos são tipicamente sintetizadas com uma extensão N-terminal de amino ácidos conhecida como peptídeo sinal. Este peptídeo sinal direciona a proteína a entrar na via de compartimentalização, e é tipicamente clivado da proteína madura como uma etapa inicial da compartimentalização. Para uma proteína extracelular, a via secretória tipicamente envolve a inserção cotraducional no retículo endoplasmático com a clivagem do peptídeo sinal ocorrendo neste estágio. A proteína madura passa então pelo complexo de Golgi em vesículas que se fundem com a membrana plasmática liberando então a proteína no espaço extracelular. Proteínas destinadas para outros compartimentos seguem uma via similar. Por exemplo, proteínas que são destinadas para o retículo endoplasmático ou o complexo de Golgi seguem este esquema, mas estas são retidas especificamente no compartimento apropriado. Em plantas, algumas proteínas são também endereçadas para o vacúolo, um outro compartimento membranar no citoplasma de muitas células de planta. Proteínas endereçadas ao vacúolo divergem da via acima no complexo de Golgi, onde estas entram em vesículas que se fundem ao vacúolo.

[0094] Uma característica comum destes endereçamentos de proteína é o peptídeo sinal que inicia o processo de compartimentalização. A fusão de um peptídeo sinal com uma proteína irá em muitos casos levar ao endereçamento da proteína para o reticulo endoplasmático. A eficiência desta

etapa pode também depender da sequência da própria proteína madura. Os sinais que direcionam uma proteína a um compartimento específico ao invés do espaço extracelular não são tão claramente definidos. Parece que muitos dos sinais que direcionam uma proteína para compartimentos específicos estão contidas na sequência de amino ácidos da proteína madura. Isto tem sido demonstrado para algumas proteínas endereçadas ao vacúolo, mas ainda não é possível definir precisamente estas sequências. Parece que a secreção para o espaço celular é a via "padrão" para uma proteína que contém uma sequência sinal, mas nenhum outro sinal de compartimentalização. Portanto, uma estratégia para direcionar proteínas Cry para fora do citoplasma é fusionar os genes de proteínas Cry sintéticas a sequências de ADN codificando peptídeos sinais de planta conhecidos. Estes genes de fusão irão originar proteínas cry que entram na via secretória, o que leva a uma secreção extracelular ou endereçamento para o vacúolo e outros compartimentos.

[0095] Sequências sinais para vários genes de planta tem sido descritos. Uma destas sequências, a da proteína relacionada a patogênese de tabaco PR1b foi previamente descrita (Cornelissen et al., 1986). A proteína PR1b é normalmente localizada no espaço extracelular. Um outro tipo de peptídeo sinal é contido nas proteínas de armazenamento de sementes de legumes. Estas proteínas são localizadas no corpo proteico das sementes, que é um compartimento semelhante a vacúolos encontrado em sementes. Uma sequência de ADN de peptídeo sinal para a subunidade β da proteína de

armazenamento 7S do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), PvuB foi descrito (Doyle et al., 1986). Baseado nestas sequências publicadas, genes podem ser sintetizados quimicamente usando oligonucleotídeos que codificam os peptídeos sinal para PR1b e PvuB. Em alguns casos para conseguir a secreção ou compartimentalização de proteínas heterólogas, pode ser necessário a inclusão de alguma sequência de amino ácidos além do sítio normal de clivagem do peptídeo sinal. Isto pode ser necessário para garantir a clivagem apropriada do peptídeo sinal.

Produção de Plantas Transgênicas

[0096] Qualquer método conhecido na arte pode ser usado na transformação de uma planta ou célula de planta com um ácido nucleico da presente invenção. Moléculas de ácido nucleico podem ser incorporadas no ADN da planta (ex., ADN genômico ou ADN cloroplastidial) ou ser mantido ser a inserção no ADN da planta (ex., através do uso de cromossomos artificiais). Métodos apropriados para introduzir moléculas de ácido nucleico em células de planta incluem microinjeção (Crossway et al., 1986, *Biotechniques* 4:320-334); eletroporação (Riggs et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:5602-5606; D'Halluin et al., 1992, *Plant Cell* 4:1495-1505); transformação mediada por *Agrobacterium* (U.S. Patent Nos. 5.563.055 e 5.981.840, Osjoda et al., 1996, *Nature Biotechnology* 14:745-750; Horsch et al., 1984, *Science* 233:496-498, Fraley et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:4803, e *Gene Transfer to Plants*, Potrykus, ed., Springer-Verlag, Berlin 1995); transferência direta de

genes (Paszkowski et al., 1984, *EMBO J.* 3:2717-2722); aceleração de partículas por balística (Patentes U.S. Nos. 4.945.050; 5.879.918; 5.886.244; 5.932.782; Tomes et al., 1995, "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment, in Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods, ed. Gamborg e Phillips, Springer-Verlag, Berlin; e McCabe et al., 1988, *Biotechnology* 6:923-926); transformação mediada por vírus (Patentes U.S. Nos. 5.889.191, 5.889.190, 5.866.785, 5.589.367 e 5.316.931); transformação de pólen De Wet et al., 1985, in The Experimental Manipulation of Ovule Tissues, ed. Chapman et al., Longman, New York, pp. 197-209); transformação de Lec 1 (Peiddo de Patente Ser. No. 09/435.054; Publicação Interncaional No. WO 00/28058); transformação mediada por capilar (Kaeppler et al., 1990, *Plant Cell Reports* 9:415-418; Kaeppler et al., 1992, *Theor. Appl. Genet.* 84:560-566); e tecnologias de transformação de cloroplastos (Bogorad, 2000, *Trends in Biotechnology* 18: 257-263; Ramesh et al., 2004, *Methods Mol Biol.* 274:301-7; Hou et al., 2003, *Transgenic Res.* 12:111-4; Kindle et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:1721-5; Bateman e Purton, 2000, *Mol Gen Genet.* 263:404-10; Sidorov et al., 1999, *Plant J.* 19:209-216).

[0097] A escolha dos protocolos de transformação usados para gerar plantas e células de planta transgênicas pode variar dependendo do tipo de planta ou célula, ex., monocotiledônea ou dicotiledônea, que serão alvos para transformação. Exemplos de protocolos de transformação particularmente apropriados para um tipo particular de planta incluem aqueles para: batata

(Tu et al., 1998, *Plant Molecular Biology* 37:829-838; Chong et al., 2000, *Transgenic Research* 9:71-78); soja (Christou et al., 1988, *Plant Physiol.* 87:671-674; McCabe et al., 1988, *BioTechnology* 6:923-926; Finer e McMullen, 1991, *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27P:175-182; Singh et al., 1998, *Theor. Appl. Genet.* 96:319-324); milho (Klein et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:4305-4309; Klein et al., 1988, *Biotechnology* 6:559-563; Klein et al., 1988, *Plant Physiol.* 91:440-444; Fromm et al., 1990, *Biotechnology* 8:833-839; Tomes et al., 1995, "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment," in Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods, ed. Gamborg (Springer-Verlag, Berlin)); cereais (Hooykaas-Van Slogteren et al., 1984, *Nature* 311:763-764; Patente U.S. No. 5.736.369).

[0098] Em algumas concretizações, mais de uma construção é usada para transformação na geração de plantas e células de plantas transgênicas. Construções múltiplas podem ser incluídas em posições cis ou trans. Em concretizações preferidas, cada construção tem um promotor e outras sequências regulatórias.

[0099] Células de planta transformadas que são derivadas de uma das técnicas de transformação mencionadas acima podem ser cultivadas para regenerar uma planta inteira que possui o genótipo transformado e portanto o fenótipo desejado. Tais técnicas de regeneração dependem da manipulação de certos fito-hormônios em um meio de crescimento de cultura de tecido, tipicamente, contanto com um biocida e/ou herbicida marcador

que foi introduzido junto com as sequências nucleotídicas desejadas. Regeneração de plantas a partir de protoplastos cultivados é descrita na arte (e.g., Evans *et al.*, Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture, pp. 124-176, MacMillilan Publishing Company, New York, 1983; e Binding, Regeneration of Plants, Plant Protoplasts, pp. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985). Regeneração também pode ser obtida a partir de calos de plantas, explantes, órgãos, ou partes destes. Tais técnicas de regeneração são também descritas na arte (e.g., Klee *et al.* 1987, Ann. Rev. of Plant Phys. 38:467-486).

[0100] O termo "planta" inclui plantas inteiras, órgãos/estruturas vegetativas aéreas (ex., folhas, caules e tubérculos), raízes, flores e órgãos/estruturas florais, (ex., brácteas, sépalas, pétalas, estames, carpelos, anteras e óvulos), semente (incluindo embrião, endosperma, e casca da semente) e fruto (o ovário maduro), tecidos da planta (ex., tecido vascular, tecido fundamental, e semelhantes) e células (ex., células guarda, células ovo, tricomas, e semelhantes), e a progênie dos mesmos. A classe de plantas que podem ser usadas em métodos da presente invenção incluem a classe de plantas superiores e inferiores suscetíveis a técnicas de transformação, incluindo angiospermas (plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas), gimnospermas, samambaias, e algas multicelulares. Plantas de uma variedade de níveis de poliploidia, incluindo plantas aneuplóides, poliplóides, haplóides e hemizigotas são incluídas também.

[0101] As moléculas de ácido nucleico da invenção podem ser usadas para conferir os traços desejados em essencialmente qualquer planta. Portanto, a invenção usou um amplo espectro de plantas incluindo espécies dos gêneros *Agrotis*, *Allium*, *Ananas*, *Anacardium*, *Apium*, *Arachis*, *Asparagus*, *Athamantia*, *Atropa*, *Avena*, *Bambusa*, *Beta*, *Brassica*, *Bromus*, *Browaalia*, *Camellia*, *Cannabis*, *Carica*, *Ceratonia*, *Cicer*, *Chenopodium*, *Chicorium*, *Citrus*, *Citrullus*, *Capsicum*, *Carthamus*, *Cocos*, *Coffea*, *Coix*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Datura*, *Daucus*, *Dianthus*, *Digitalis*, *Dioscorea*, *Elaeis*, *Eliusine*, *Euphorbia*, *Festuca*, *Ficus*, *Fragaria*, *Geranium*, *Glycine*, *Graminae*, *Gossypium*, *Helianthus*, *Heterocallis*, *Hevea*, *Hibiscus*, *Hordeum*, *Hyoscyamus*, *Ipomoea*, *Lactuca*, *Lathyrus*, *Lens*, *Lilium*, *Linum*, *Lolium*, *Lotus*, *Lupinus*, *Lycopersicon*, *Macadamia*, *Macrophylla*, *Malus*, *Mangifera*, *Manihot*, *Majorana*, *Medicago*, *Musa*, *Narcissus*, *Nemesia*, *Nicotiana*, *Onobrychis*, *Olea*, *Olyreae*, *Oryza*, *Panicum*, *Panicum*, *Panieum*, *Pannisetum*, *Pennisetum*, *Petunia*, *Pelargonium*, *Persea*, *Pharoideae*, *Phaseolus*, *Phleum*, *Picea*, *Poa*, *Pinus*, *Pistachia*, *Pisum*, *Populus*, *Pseudotsuga*, *Pyrus*, *Prunus*, *Pseutotsuga*, *Psidium*, *Quercus*, *Ranunculus*, *Raphanus*, *Ribes*, *Ricinus*, *Rhododendron*, *Rosa*, *Saccharum*, *Salpiglossis*, *Secale*, *Senecio*, *Setaria*, *Sequoia*, *Sinapis*, *Solanum*, *Sorghum*, *Stenotaphrum*, *Theobromus*, *Trigonella*, *Trifolium*, *Trigonella*, *Triticum*, *Tsuga*, *Tulipa*, *Vicia*, *Vitis*, *Vigna*, e *Zea*.

[0102] Em concretizações específicas, as plantas transgênicas são plantas de milho, batata, arroz, soja, alfafa, girassol, canola, ou algodão.

[0103] Plantas transgênicas podem ser crescidas e polinadas tanto com a mesma linhagem transformada quanto linhagens diferentes. Duas ou mais gerações das plantas podem ser crescidas para garantir que a expressão da molécula de ácido nucleico, polipeptídeo e/ou característica fenotípica desejados é mantida de maneira estável e herdada. Alguém com habilidade básica na arte irá reconhecer que a molécula de ácido nucleico da presente invenção após ser incorporada de maneira estável em plantas transgênicas e confirmada estar operacional, esta pode ser introduzida em outras plantas através de cruzamento sexual. Qualquer uma de um número de técnicas padrão de cultivo pode ser usada, dependendo da espécie a ser cruzada.

[0104] Em certas concretizações os polinucleotídeos das concretizações podem ser agrupados com qualquer combinação de sequências de polinucleotídeos de interesse em ordem a criar plantas com o traço desejado. Por exemplo, os polinucleotídeos das construções podem ser agrupados com qualquer outro polinucleotídeo codificando polipeptídeos com atividade pesticida e/ou inseticida, como outras proteínas tóxicas *Bt* (descritas em, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 5.366.892; 5.747.450; 5.737.514; 5.723.756; 5.593.881; e Geiser et al. (1986) Gene 48:109), lectinas (Van Damme et al. (1994) Plant Mol. Biol. 24:825), pentina (descrita em Patente U.S. No. 5.981.722), e semelhantes. As combinações geradas podem incluir também cópias múltiplas de qualquer um dos polinucleotídeos de interesse. Os polinucleotídeos das concretizações podem ser também agrupados com qualquer outro

gene ou combinação de genes para produzir plantas com uma variedade de combinações de traços desejados incluindo, mas não limitado a, traços desejáveis para a alimentação animal como genes com alto conteúdo de óleo (ex., Patente U.S. No. 6.232.529); amino ácidos balanceados (ex., hordotioninas (Patentes U.S. Nos. 5.990.389; 5.885.801; 5.885.802; e 5.703.409); alto nível de lisina em cevada (Williamson *et al.* (1987) *Eur. J. Biochem.* 165:99-106; e WO 98/20122) e proteínas com altos níveis de metionina (Pedersen *et al.* (1986) *J. Biol. Chem.* 261:6279; Kirihara *et al.* (1988) *Gene* 71:359; e Musumura *et al.* (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:123); digestibilidade aumentada (ex., proteínas de armazenamento modificadas (Pedido de Patente U.S. Ser. No. 10/053,410, depositado em 7 de novembro de 2001)); e tioredoxinas (Pedido de Patente U.S. Ser. No. 10/005.429, depositada em 3 de dezembro de 2001); as descobertas que estão incorporadas aqui por referência.

[0105] Os polinucleotídeos das concretizações podem também ser agrupadas com traços desejáveis para doenças ou resistência a herbicidas (ex., genes de detoxificação de fumonisina (Patente U.S. No. 5.792.931)); genes de avirulência e resistência a doenças (Jones *et al.* (1994) *Science* 266:789; Martin *et al.* (1993) *Science* 262:1432; Mindrinos *et al.* (1994) *Cell* 78:1089); mutantes para acetolactato sintase (ALS) que leva à resistência a herbicidas como as mutações S4 e/ou Hra; genes codificando resistência a inibidores de glutamina sintase como fosfinotricina ou basta (ex., genes bar ou PAT); e resistência a glifosato (genes EPSPS e GAT (glifosato acetil transferase) Castle *et al.* (2004) *Science* 304:1151)); e traços

desejáveis para o processamento ou os produtos de processamento como alto nível de óleo (ex., Patente U.S. No. 6.232.529); óleos modificados (e.g., genes de dessaturase de ácidos (Patente U.S. No. 5.952.544; WO 94/11516)); amidos modificados (ex., ADPG pirofosforilases (AGPase), amido sintase (SS), enzimas ramificadoras de amido (SBE), e enzimas deramificadoras de amido (SDBE)); e polímeros e bioplásticos (ex., Patente U.S. No. 5.602.321; beta-cetotiolase, polihidroxibutirato sintase, e acetoacetyl-CoA redutase (Schubert et al. (1988) J. Bacteriol. 170:5837-5847) facilitam a expressão de polihidroxialcanoates (PHAs)); as descobertas que estão aqui incorporadas por referência. Alguém poderia também combinar os polinucleotídeos das concretizações com polinucleotídeos provendo traços agronômicos como esterilidade masculina (cer ex., Patente U.S. No. 5.583.210), resistência do talo, tempo de floração, ou traços tecnológicos de transformação como regulação do ciclo celular ou endereçamento genes (ex., WO 99/61619, WO 00/17364, e WO 99/25821); as descobertas que estão aqui incorporadas por referência.

[0106] Estas combinações agrupadas podem ser criadas por qualquer método incluindo, mas não limitado a, cultivo por cruzamento de plantas por qualquer metodologia convencional ou TopCross, ou transformação genética. Se as sequências são agrupadas por transformação genética das plantas, as sequências polinucleotídicas de interesse podem ser combinadas a qualquer hora e em qualquer ordem. Por exemplo, uma planta transgênica constituindo um ou mais traços desejados pode ser usada como alvo para introduzir traços adicionais por

transformação subsequente. Os traços podem ser introduzidos simultaneamente em um protocolo de co-transformação com os polinucleotídeos de interesse sendo providos por uma combinação de cassetes de transformação. Por exemplo, se duas sequências serão introduzidas, as duas sequências podem estar contidas em cassetes de transformação separados (trans) ou contidos no mesmo cassete de transformação (cis). Expressão das sequências podem ser dirigidas pelo mesmo promotor ou por promotores diferentes. Em certos casos, pode ser desejável introduzir um cassete de transformação que irá suprimir a expressão do polinucleotídeo de interesse. Isto pode ser combinado com qualquer combinação de outros cassetes de supressão ou superexpressão para gerar a combinação desejada de traços na planta. É adicionalmente reconhecido que as sequências de polinucleotídeos podem ser agrupadas em uma localidade genômica desejada usando um sistema de recombinação sítio-específico. Veja, ex., WO 99/25854, WO 99/25840, WO 99/25855, e WO 99/25853, todos aqui incorporados por referência.

Determinação da Expressão em Plantas Transgênicas

[0107] Qualquer método conhecido na arte pode ser usado para determinar o nível de expressão em uma planta de uma molécula de ácido nucleico da invenção ou polipeptídeo codificado destes. Por exemplo, o nível de expressão em uma planta de um polipeptídeo codificado por uma molécula de ácido nucleico da invenção pode ser determinado por imunoensaio, eletroforese quantitativo em gel, etc. Expressão de moléculas de ácido

nucleico da invenção pode ser medida diretamente PCR quantitativo por transcrição reversa (qRT-PCR) apartir de ARN isolado da planta. Adicionalmente, o nível de expressão em uma planta de um polipeptídeo codificado por uma molécula de ácido nucleico da invenção pode ser determinado pelo grau em que o fenótipo da planta é alterado. Em uma concretização específica, a resistência a insetos aumentada é o fenótipo a ser analisado.

[0108] Como usado aqui, "resistência a insetos aumentada" se refere à resistência aumentado de uma planta transgênica expressando um polipeptídeo da invenção ao consumo e/ou infestação por uma praga de inseto quando comparado a uma planta não expressando um polipeptídeo da invenção. Resistência aumentada pode ser medida em um número de maneiras. Em uma concretização, a resistência aumentada é medida pelo dano reduzido a uma planta expressando o polipeptídeo da invenção comparado com uma planta não expressando o polipeptídeo da invenção após o mesmo período de incubação com o inseto. Dano ao inseto pode ser avaliado visualmente. Por exemplo em plantas de algodão, o dano após a infestação pode ser medido através da visualização direta dos cupulhos de plantas de algodão por sinais de consumo por insetos. Em uma outra concretização, a resistência aumentada é medida pelo aumento da produtividade da planta expressando um polipeptídeo da invenção quando comparada a uma planta não expressando um polipeptídeo da invenção após o mesmo período de incubação com os insetos. Em concretizações em particular, as pragas de inseto são da ordem de insetos Lepidópteros

incluindo *Heliothine*, *Agrotis*, *Pseudoplusia*, *Chilo*, *Spodoptera spp* e outros.

[0109] Determinações podem ser feitas usando plantas inteiras, tecidos destas, ou culturas de células de planta.

[0110] O conteúdo de todos os artigos publicados, livros, manuais de referência e resumos citados aqui, estão aqui incorporados por referência na sua íntegra para descrever mais detalhadamente o estado da arte na qual a invenção pertence.

[0111] Como várias modificações podem ser feitas a matéria técnica descrita acima sem fugir do escopo e espírito da presente invenção, é intencional que todos as matérias técnicas contidas na descrição acima e/ou definidas nas reivindicações anexadas sejam interpretadas como descritivos e ilustrativos da presente invenção. Modificações e variações da presente invenção são possíveis a luz dos ensinamentos acima.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Mistura de Gene Único

[0112] A toxina Cry1Ac é atualmente a mais potente toxina conhecida para o controle de insetos *Heliothis* em algodão. Porém, Cry1Ac possui uma atividade muito pequena em pestes secundárias da classe *Spodoptera*. A toxina Cry1Ab é uma atividade inicial excelente para o controle de pestes de insetos do algodão uma vez que apresenta uma atividade

ligeiramente menor em *H. zea* do que Cry1Ac, porém atividade bem superior em *S. exigua*. Para superar a deficiência desse produto, um gene Cry1Ab-like foi misturado para obter polipeptídeos derivados de Cry1 que apresentam atividade aumentada em *Heliothine* enquanto retém potencialidade essencialmente completa em *Spodoptera*. Um método usado para gerar polipeptídeos derivados de Cry1 foi a mistura de gene único ("single gene shuffling") (mutagênese combinada com mistura). A mistura de Cry1Ab foi executada como a seguir. Dois fragmentos sobrepostos de uma porção 5' do gene Cry1Ab desde o início de tradução ao sítio *kpnI* foram amplificados através de duas reações de PCR separadas a partir de uma cepa *Bt kurstaki* que contém um gene Cry1Ab1. Esses fragmentos foram adicionalmente fragmentados por endonuclease e montados sob certas condições mutacionais para criar uma série ou biblioteca de genes misturados. Essa porção misturada contém a região que codifica a toxina madura. Com o intuito de clonar e expressar a biblioteca de genes misturados, nós construímos um vetor de trânsito *E. coli-Bt* que contém um gene de resistência à tetraciclina e dois replicons de ambos os hospedeiros. O vetor também contém a porção 3' remanescente (não misturada) do gene *cry1Ca* desde o sítio *KpnI* ao sítio de término de tradução juntamente com o promotor transcricional de *cry1Ca* e o terminador de *cry1Ac*. Quando a biblioteca de genes misturados foi clonada nesse vetor, as proteínas completas de 135-kDa foram produzidas. A biblioteca de genes misturados foi expressa em hospedeiro *Bt* que não contém *cry* chamado de *BtG8*, que foi derivado da cepa HD1 através de cura de plasmídeo. A seleção foi feita para assegurar um alta competência de

transformação por eletroporação que é requerida para a obtenção de uma biblioteca misturada diversificada. O hospedeiro selecionado, *BtG8*, mostrou um nível de competência acima de 10^6 transformantes por 1 μ g de ADN. A biblioteca de genes misturados foi obtida através de transformação sequencial de *E. coli* XL-1 Blue, *E. coli* GM2163 e *BtG8*. XL-1 Blue foi usada pela alta eficiência de transformação. O plasmídeo foi preparado a partir de células transformadas de XL-1 Blue, e uma pequena porção foi examinada através de eletroforese em gel para assegurar a ausência de quantidades visíveis de moléculas de vetores sem ADN misturado. GM2163 foi usada para preparar ADN não metilado para transformação através de eletroporação de *BtG8*. A *BtG8* transformada que cresceu em placas de tetraciclina foram colocadas em placas de 96 poços por robô. Essas placas foram incubadas até esporulação e culturas foram usadas como inóculo para produção de amostra de ensaio. Nós usamos varredura de duas fileiras de insetos para obter alta produtividade. A primeira fileira foi para eliminar variantes sem qualquer atividade detectável. As amostras de ensaio da primeira fileira foram produzidas em meio líquido CYS como descrito em uma publicação de Yamamoto (Identification of entomocidal toxins of *Bacillus thuringiensis* by high-performance liquid chromatography. in Analytical chemistry of *Bacillus thuringiensis*. ed. Hickie, L.A. e Fitch, W.L., American Chemical Society, Washington DC, USA, 46-60, 1990) em placas de 96 poços rasos. Nesse estágio, meio de cultura contendo cristais e esporos foi testado com larvas recém-nascidas de *H. zea* em placas de 96 poços contendo uma dieta artificial de insetos. Essas variantes apresentando

atividade foram selecionadas para a próxima etapa. Para a varredura da segunda fileira, as proteínas cristalinas foram purificadas a partir de 1 ml de meio de cultura produzido em placas de 96 poços fundos pela solubilização diferencial entre pH 10,5 e pH 4,4. Os cristais foram solubilizados em pH 10,5 com 2% de 2-mercaptoetanol, e as proteínas cristalinas solubilizadas foram precipitadas em pH 4,4. Após concentrações de proteínas serem determinadas, diluições seriadas foram feitas e amostradas contra larvas de *H. zea* usando ensaio de incorporação de dieta de insetos. Após a varredura de milhares de variantes, nós encontramos um número substancial de proteínas apresentando atividade aumentada em *H. zea* em comparação com a Cry1Ab parental. Essas variantes melhoradas foram então testadas contra *Spodoptera exigua*.

[0113] Polipeptídeos que resultaram de mistura de gene único foram varridos para atividade aumentada em *H. zea* relativo à Cry1Ab selvagem. AR2 (SEQ ID NOS:1 e 2) e AR6 (SEQ ID NOS:3 e 4) foram identificadas como polipeptídeos derivados de Cry1 que apresentam atividade aumentada contra *H. zea* (Fig. 1). A atividade de AR6 foi adicionalmente investigada pela comparação relativa inversa de valores EC₅₀ para pró-toxinas de AR6, Cry1Ab, Cry1Ac, e Cry1Ca em *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, e *Spodoptera exigua* (Fig. 2). Pró-toxinas purificadas Cry1Ab, AR6, Cry1Ac, e Cry1Ca foram introduzidas na dieta artificial em seis doses e em 24 replicatas para determinar o EC₅₀ de cada pró-toxina contra três insetos. O experimento foi repetido três vezes e valores EC₅₀ foi expresso com uma média das três tentativas. Os valores EC₅₀ são então

convertidos para valores relativos inversos. Já que Cry1Ac apresenta o menor EC_{50} (maior atividade específica) em *Heliothis virescens* e *Helicoverpa zea* foi dado um valor de 1,0 a cada uma das respectivas pestes de insetos. Outras amostras de pró-toxinas apresentaram valores EC_{50} mais altos para tanto *H. virescens* quanto *H. zea* (menor atividade específica) e foram convertidos a valores relativos ao da Cry1Ac. De mesmo modo, Cry1Ca apresenta o menor valor EC_{50} para *Spodoptera exigua* e por isso lhe foi dado um valor relativo de '1,0' naquela peste. Valores EC_{50} de outras pró-toxinas foram maiores (menor atividade específica) e receberam um valor relativo menor para esse peste. Esses dados mostraram que AR6 apresenta quase o dobro de atividade específica que Cry1Ab selvagem para tanto *H. zea* quanto *S. exigua* (Fig. 2). Uma descrição das diferenças de amino ácidos entre a toxina Cry1Ab parental e os clones misturados é apresentada na Tabela 3.

[0114] Um experimento de mistura de gene único foi conduzido para melhorar a atividade de Cry1Ca em *Spodoptera*. Como foi feito na mistura do gene cry1Ab, um molde de ADN cry1Ca foi submetido à mutagênese e mistura de ADN. Proteínas produzidas a partir de variantes misturadas foram varridas para melhora da atividade em *S. exigua*. Uma das variantes, CR62 (SEQ ID NOS: 7 e 8), apresentou um EC_{50} aumentado em ~3 vezes comparado à proteína Cry1Ca selvagem (Fig. 3).

Exemplo 2: Construção do Gene CR62 Sintético

[0115] As sequências de ADN de CR62 e o gene parental, Cry1Ca, foram modificando usando uso de códons aleatório para criar genes completamente sintéticos capazes de serem expressos em plantas (SEQ ID NO: 9 e SEQ ID NO:31, respectivamente. A Tabela 4 provê uma descrição das diferenças da sequência de amino ácidos codificados entre esses genes. Seguindo a construção dos genes sintéticos CR62 e Cry1Ca, a regiões codificantes foram clonadas em vetor binário atrás de um promotor forte constitutivo de vírus vegetal e os plasmídeos subsequentes foram transformados em *Agrobacterium tumefaciens* C58. Essas cepas foram testadas para eficácia *in planta* usando uma infiltração de *Agrobacterium* em folha baseada no sistema de expressão transiente seguida de bioensaios de discos foliares com *Spodoptera exigua*. Usando esse ensaio foi mostrado que ambos os genes expressaram atividade inseticida apesar do gene misturado CR62 gene apresentar um melhor desempenho que o parente selvagem não misturado (dados não mostrados).

Exemplo 3: Construção dos Genes Sintéticos MR8' e AR6

[0116] A sequência de ADN de AR6 foi alvo de modificação para criar uma versão sintética da região codificante de AR6 (SEQ ID NOS: 5 e 6) como descrito para CR62 na seção 6.2. Porém, nesse exemplo somente a extremidade 5' de AR6 codificando o domínio N-terminal da pró-toxina e toxina foram alvo para a ressíntese. Essa região codificante N-terminal foi

ligada à região codificante sintética C-terminal pré-existente da pró-toxina do gene sintético CR62 gene para formar um gene completo da pró-toxina para expressão em plantas. No processo de produção de um gene AR6 sintético, um gene precursor foi construído. Esse gene, chamado de MR8' (SEQ ID NO:11), codifica oito resíduos de amino ácidos diferentes na porção pró-toxina da proteína (Tabela 3).

Exemplo 4: Teste *in planta* do Gene AR6 Sintético

[0117] Seguindo a construção dos genes MR8' e AR6 sintéticos, as regiões codificantes foram clonados em um vetor binário com um promotor forte constitutivo de vírus vegetal e os plasmídeos subsequentes foram transformados em *Agrobacterium tumefaciens* C58. Essas cepas foram testadas para eficácia *in planta* usando infiltração de *Agrobacterium* em folha baseado no sistema de expressão transiente seguida de bioensaios de insetos em discos foliares. Tanto AR6 quanto MR8' sintéticos foram expressos em ensaio transiente em folha como mostrado por análise de Western Blot (Fig. 4).

[0118] Para testar a atividade *in planta*, um disco foliar expressando um polipeptídeo de interesse foi provido a uma peste. Após um período de incubação de 24 horas, a atividade de alimentação da peste no disco foliar foi determinada por observação visual. Controles positivos para atividade para *H. zea* e *S. exigua* foram genes codificando polipeptídeos Cry2Ab-like (*) e CR62, respectivamente. Esses resultados mostraram que tanto AR6 quanto MR8' sintéticos conferem alto nível de

resistência a tanto *H. zea* (Fig. 5A) quanto *S. exigua* (Fig. 5B). Discos foliares infiltrados com *Agrobacterium* com ausência de um gene Cry foram completamente consumidos por larvas de inseto durante o período de ensaio (não mostrado).

Exemplo 5: Mistura Adicional Usando MR8' como Parental

[0119] Para adicionalmente melhorar a atividade de MR8', um segundo ciclo de mistura de ADN foi desempenhado usando MR8' como clone parental. A mistura foi desempenhada no molde de ADN MR8' fragmentado pela adição direta de diversidade de sequência com oligonucleotídeos. Uma vez que o gene MR8' codifica uma pró-toxina, a mistura foi limitada à região da toxina ativa que é responsável pelas propriedades inseticidas. Dois tipos de diversidade de sequência foram usadas para incorporar em reações de misturas: diversidade filogenética e aleatória gerada por computador. Diversidade filogenética originada a partir do alinhamento de acertos do primeiro ciclo AR6, MR8', e polipeptídeos selvagens Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ae, e Cry1Ag. Diversidade aleatória foi gerada através da escolha de posições aleatórias de amino ácidos e direcionando mudanças de amino ácidos tanto conservativas quanto não-conservativas nestas posições. Ambos os tipos de diversidade foram incorporadas no gene parental MR8' e proteína codificada em um domínio através de base de domínio. Várias bibliotecas foram construídas, cada um focando em um tipo selecionado de diversidade e aplicado a regiões isoladas de domínio da toxina ou na região inteira da toxina. Seguindo a mistura de ADN, cada fragmento de biblioteca amplificado por

PCR foi reintroduzido no fragmento remanescente da pró-toxina MR8' através de "PCR stitching". A biblioteca de pró-toxinas reconstruídas foi então clonada em um vetor pUC de modo que os polipeptídeos derivados Cry1 foram expressos em *E. coli* a partir do promotor LacZ.

[0120] Com o intuito de acessar a atividade de polipeptídeos derivados de Cry1 contra *H. zea*, varredura de alta produtividade usando uma dieta artificial contendo células inteiras de *E. coli* expressando cada um dos polipeptídeos derivados de Cry1 em um formato de arranjo foi desempenhado (dados não mostrados). Essas variantes apresentando alto nível de atividade foram então testadas para atividade *in planta*. A diversidade de amino ácidos presente nas variantes testadas é mostrada na Tabela 5. As sequências de amino ácidos das regiões misturadas da toxina assim como as sequências nucleotídicas codificando toda a pró-toxina são providas por SEQ ID NOS: 11-28.

[0121] Para iniciar ensaios *in planta*, todas as variantes altamente ativas derivadas de Cry1 foram clonadas em vetor de expressão em plantas baseado em *Agrobacterium tumefaciens*. Os plasmídeos binários foram então transformados em uma *Agrobacterium* hospedeira. Os polipeptídeos derivados de Cry1 foram então varridos através de co-cultivo cada um em quatro réplicas com folhas de *N. benthamiana* (usando infiltração forçada de cada cultura respectiva). Discos foliares foram excisados de áreas infiltradas e infestados com larvas individuais de terceiro estágio de *H. zea* ou quarto estágio de

S. exigua. Após 24 horas, a atividade de alimentação foi determinada por captura de vídeo da área remanescente da folha expressa em pixels.

[0122] A Figura 6 mostra a atividade dos polipeptídeos indicados derivados de CryI em *H. zea*. A Figura 7 mostra a atividade dos polipeptídeos indicados derivados de CryI em *S. exigua*. Todos os polipeptídeos testados derivados de CryI apresentaram atividade aumentada contra *H. zea* quando comparada ao polipeptídeo parental MR8' enquanto retendo atividade contra *S. exigua* que é tão boa quanto a de MR8'.

Tabela 1: Sequências derivadas de CryI e Cry 1

Nome da Variante	Região Completa da Pró-toxina	Região Misturada	Região da Toxina Madura	Tipo de Sequência	SEQ ID NO
AR2	1-3543 pb	1-2175 pb	85-1857 pb	ácido nucleico	1
AR2	1-1181 aa	1-725 aa	29-619 aa	polipeptídeo	2
AR6	1-3543 pb	1-2175 pb	85-1857 pb	ácido nucleico	3
AR6	1-1181 aa	1-725 aa	29-619	polipeptídeo	4
AR6 Sintética	1-3546 pb	1-2178 pb	88-1860 pb	ácido nucleico	5
AR6 Sintética	1-1182 aa	1-726 aa	30-620 aa	polipeptídeo	6
CR62	1-3567 pb	1-2199 pb	82-1890 pb	ácido nucleico	7
CR62	1-1189 aa	1-733 aa	28-630 aa	polipeptídeo	8
CR62 Sintética	1-3567 pb	1-2199 pb	82-1890 pb	ácido nucleico	9
CR62 Sintética	1-1189 aa	1-733 aa	28-630 aa	polipeptídeo	10
MR8'	1-3546 pb	88-1860 pb	88-1860 pb	ácido nucleico	11
MR8'	1-1182 aa	30-620 aa	30-620 aa	polipeptídeo	12
Variante 41	1-3546 pb	88-1860 pb	88-1860 pb	ácido nucleico	13
Variante 41	1-1182 aa	30-620 aa	30-620 aa	polipeptídeo	14
Variante 75	1-3546 pb	88-1860 pb	88-1860 pb	ácido nucleico	15
Variante 75	1-1182 aa	30-620 aa	30-620 aa	polipeptídeo	16

Variante 80	1-3546 pb	88-1860 pb	88-1860 pb	ácido nucleico	17
Variante 80	1-1182 aa	30-620 aa	30-620 aa	polipeptídeo	18
Variante 85	1-3546 pb	88-1860 pb	88-1860 pb	ácido nucleico	19
Variante 85	1-1182 aa	30-620 aa	30-620 aa	polipeptídeo	20
Variante 88	1-3546 pb	88-1860 pb	88-1860 pb	ácido nucleico	21
Variante 88	1-1182 aa	30-620 aa	30-620 aa	polipeptídeo	22
Variante 90	1-3546 pb	88-1860 pb	88-1860 pb	ácido nucleico	23
Variante 90	1-1182 aa	30-620 aa	30-620 aa	polipeptídeo	24
Variante 5-40	1-3546 pb	88-1860 pb	88-1860 pb	ácido nucleico	25
Variante 5-40	1-1182 aa	30-620 aa	30-620 aa	polipeptídeo	26
Variante 5-44	1-3546 pb	88-1860 pb	88-1860 pb	ácido nucleico	27
Variante 5-44	1-1182 aa	30-620 aa	30-620 aa	polipeptídeo	28
CrylCa referência		--		ácido nucleico	29
CrylCa referência		--		polipeptídeo	30
CrylCa Sintética	1-3567 pb	--	82-1890 pb	ácido nucleico	31
CrylCa Sintética	1-1189 aa	--	28-630 aa	polipeptídeo	32
CrylAb referência		--	85-1866 pb	ácido nucleico	33
CrylAb referência	1-1155 aa	--	29-622 aa	polipeptídeo	34
Cry2Ab-like (*) referência	1-633 aa	--		polipeptídeo	35
CrylAc referência	1-1178 aa	--	29-623	polipeptídeo	36

Fontes para todos os genes e proteínas de referência:

http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/index.html

Revisão da Nomenclatura para as Proteínas Cristalinas Pesticidas
Bacillus thuringiensis N. Crickmore, D.R. Zeigler, J. Feitelson, E.
 Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, e D.H. Dean. Microbiology
 and Molecular Biology Reviews (1998) Vol 62: 807-813

Tabela 2: Tabela de Códon

Aminoácidos			Códon							
Alanina	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU				
Cisteína	Cys	C	UGC	UGU						
Ácido aspártico	Asp	D	GAC	GAU						
Ácido glutâmico	Glu	E	GAA	GAG						
Fenilalanina	Phe	F	UUC	UUU						
Glicina	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU				
Histidina	His	H	CAC	CAU						
Isoleucina	Ile	I	AUA	AUC	AUU					
Lisina	Lys	K	AAA	AAG						
Leucina	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU		
Metionina	Met	M	AUG							
Asparagina	Asn	N	AAC	AAU						
Prolina	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU				
Glutamina	Gln	Q	CAA	CAG						
Arginina	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU		
Serina	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU		
Treonine	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU				
Valina	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU				
Triptofano	Trp	W	UGG							
Tirosina	Tyr	Y	UAC	UAU						

Tabela 3: Comparação das diferenças de sequência de amino ácidos entre CryIAb e o primeiro ciclo de acertos misturados

	Posição da sequência de amino ácidos																															
Nome da Sequência	1	2	3	8	90	101	128	133	212	261	268	271	419	466	468	469	470	471	473	598	624	626	627	629	654	666	671	679	691	697	724	
Cry1Ab (SEQIDNO:33)	M	Intervalo	D	I	E	L	R	I	Y	V	I	N	N	I	P	S	S	S	Q	T	V	A	N	E	F	E	K	K	S	R	L	L
AR2 (SEQIDNO:1)	-		H	T	G	-	-	-	-	-	V	D	-	T	D	P	E	R	R	N	F	-	S	-	-	-	E	-	-	-	-	-
AR6 (SEQIDNO:3)	-		H	T	-	-	-	-	-	-	V	D	D	T	D	P	E	R	R	N	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-
AR6 Sintética (SEQIDNO:5)	-	G	H	T	-	-	-	-	-	-	V	D	D	T	D	P	E	R	R	N	-	-	-	-	D	R	-	-	-	P	P	P
MR8' (SEQIDNO:11)	-	G	H	-	-	V	K	T	A	A	-	-	-	T	D	P	E	R	R	N	-	V	-	A	-	D	R	-	-	-	P	P

Alinhamentos de amino ácidos derivados da tradução de seqüências de ADN listadas. Um intervalo na posição 2 é inserido em seqüências de amino ácidos derivadas não-sinteticamente para acomodar inserção de um resíduo de glicina naquela posição nas seqüências polipeptídicas derivadas sinteticamente. Logo, as posições de amino ácidos correspondentes na SEQ ID NOs: 1, 3, e 33 seria uma a menos do que cada uma das coordenadas dos alinhamentos acima além da posição.

Tabela 4: Comparação das diferenças de sequências de amino ácidos entre CrylCa e clone de acerto misturado CR62

	Posição do amino ácido							
Nome da Sequência	124	268	294	312	398	453	485	586
CrylCa sintética (SEQIDNO:31)	E	T	R	D	F	D	I	I
CR62 sintética (SEQIDNO:9)	A	A	A	G	L	H	V	T
CR62 (SEQIDNO:7)	A	A	A	G	L	H	V	T

Alinhamentos de amino ácidos derivados da tradução das sequências de ADN listadas.

Tabela 5: Comparação das diferenças de sequências de amino ácidos entre a região da δ -endotoxina para CryIAb e o segundo ciclo de acertos misturados

	Posição do amino ácido																																
Nome da Sequência	35	39	56	57	61	72	81	99	104	133	175	183	188	190	232	239	242	250	251	271	373	379	390	408	428	437	439	440	441	442	444	569	
CryIab (SEQ ID NO:34)	I	I	I	N	E	L	I	R	I	Y	Y	Y	E	V	V	I	N	G	S	I	Y	V	N	F	I	I	I	P	S	S	Q	T	V
MR8' (SEQ ID NO:12)	-	-	-	-	-	V	-	K	T	-	-	H	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	D	P	E	R	N	-	
Variante 41 (SEQ ID NO:14)	-	-	-	S	-	V	-	K	-	-	-	-	-	-	V	-	A	-	-	-	-	-	-	-	T	D	P	E	R	N	-		
Variante 75 (SEQ ID NO:16)	V	V	-	-	-	V	-	K	T	-	-	H	G	-	A	-	-	-	N	-	-	-	-	-	T	D	P	E	R	N	-		
Variante 80 (SEQ ID NO:18)	V	-	-	-	-	V	-	K	T	-	F	H	-	I	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	D	P	E	R	N	-	
Variante 85 (SEQ ID NO:20)	-	-	V	-	-	V	V	K	T	-	-	H	-	I	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	D	P	E	R	N	-	
Variante 88 (SEQ ID NO:22)	V	-	-	-	-	V	-	K	T	-	-	H	-	I	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	D	P	E	R	N	-	
Variante 90 (SEQ ID NO:24)	-	-	-	-	-	V	-	K	T	-	-	H	-	I	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	D	P	E	R	N	-	
Variante 5-40 (SEQ ID NO:26)	-	-	-	-	-	V	-	K	T	F	F	H	-	-	A	-	-	-	-	V	-	I	-	-	V	T	D	P	E	R	N	-	
Variante 5-44 (SEQ ID NO:28)	-	-	-	-	-	V	-	K	T	-	-	H	-	-	A	-	-	-	-	-	F	-	-	Y	V	T	D	P	E	R	N	-	

Posições de amino ácidos são relativas a +1 sendo o primeiro resíduo da toxina madura.

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de ácido nucleico isolada **caracterizada** por compreender uma sequência de nucleotídeos de qualquer uma das SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 ou complementares a estas, onde dita molécula de ácido nucleico codifica um primeiro polipeptídeo, dito primeiro polipeptídeo apresentando atividade inseticida.
2. Molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** por compreender ainda nucleotídeos adicionais, ditos nucleotídeos adicionais codificando aminoácidos adicionais, ditos aminoácidos adicionais expressos em conjunto com dito primeiro polipeptídeo para criar uma pró-toxina.
3. Molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada** pelos ditos aminoácidos adicionais serem separados do dito primeiro polipeptídeo em um inseto.
4. Vetor **caracterizado** por compreender pelo menos uma molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1.
5. Cassete de expressão **caracterizado** por compreender pelo menos um nucleotídeo de acordo com a reivindicação 1 ligado operacionalmente a um promotor, onde o polinucleotídeo está em uma orientação senso.

6. Método de obtenção de uma célula hospedeira **caracterizada** por compreender:

- a) transformar a célula hospedeira com pelo menos um cassete de expressão de acordo com a reivindicação 5; e
- b) cultivar a dita célula hospedeira transformada sob as condições de crescimento celular.

7. Método de acordo com a reivindicação 6 **caracterizado** por dita célula hospedeira ser uma célula de planta.

8. Método para obtenção de uma planta transgênica **caracterizado** por compreender:

- a) transformar uma célula de planta com pelo menos um cassete de expressão de acordo com a reivindicação 5;
- b) cultivar dita célula de planta sob as condições de crescimento celular; e
- c) regenerar a planta transgênica a partir da célula de planta.

9. Método de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de a planta ser arroz, trigo, cana-de-açúcar, sorgo, milho, algodão, soja, alfafa, espinafre, tabaco, tomate, batata, girassol, canola, cevada ou milhete.

10. Polipeptídeo **caracterizado** por compreender uma primeira sequência polipeptídica de qualquer uma das SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, ou 28.

11. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 10 **caracterizado** por compreender ainda aminoácidos adicionais, ditos aminoácidos adicionais expressos em conjunto com dito primeiro polipeptídeo para criar uma pró-toxina.

12. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** por ditos aminoácidos adicionais serem separados do dito primeiro polipeptídeo em um inseto.

13. Método para obtenção de uma planta transgênica **caracterizado** por compreender

- a) transformar uma célula de planta com um transgene que expressa pelo menos uma de
 - (i) molécula de ácido nucleico de qualquer uma das SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 ou complementares a estas, ou
 - (ii) polipeptídeo de qualquer uma das SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, ou 28, onde a planta transgênica apresenta resistência aumentada a um inseto-praga lepidóptero quando comparada a uma planta que não é transgênica;
- b) cultivar dita célula de planta sob as condições de crescimento celular; e
- c) regenerar uma planta transgênica a partir da dita célula de planta.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato de a planta ser selecionada do grupo consistindo em milho, soja, arroz, canola, batata, algodão e girassol.

15. Método para produzir uma planta com resistência a insetos aumentada, **caracterizado** por compreender:

- a) introduzir em células de planta um construto compreendendo um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo inseticida ligado operacionalmente a um promotor funcional em células de planta para fornecer células de planta transformadas, e onde o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo inseticida é selecionado do grupo consistindo em:
 - (i) polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo das SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, ou 28;
 - (ii) polinucleotídeo compreendendo SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, ou 27;
 - (iii) polinucleotídeo complementar ao polinucleotídeo de qualquer um de (i) ou (ii);
- b) regenerar uma planta transgênica a partir das ditas células de planta transformadas, onde dito polipeptídeo de resistência a inseto quando expresso em níveis suficientes para tal aumenta a resistência a insetos em ditas plantas transgênicas quando comparadas a uma planta controle.

16. Método de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** por dito polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo ser expresso constitutivamente.

17. Método de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pela planta ser uma planta dicotiledônea.

18. Método de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pela planta ser uma planta monocotiledônea.

19. Polinucleotídeo isolado **caracterizado** por compreender um membro selecionado do grupo consistindo em:

- a) polinucleotídeo que codifica qualquer dos polipeptídeos apresentados nas SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, ou 28;
- b) polinucleotídeo compreendendo qualquer das sequências das SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, ou 27;

20. Polipeptídeo isolado **caracterizado** por compreender qualquer uma das SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, ou 28, dito polipeptídeo apresentando atividade de resistência a insetos.

21. Cassete de expressão recombinante **caracterizado** por compreender um polinucleotídeo ligado operacionalmente a um promotor, onde o polinucleotídeo codifica o polipeptídeo de acordo com a reivindicação 20.

22. Método para obtenção de uma célula hospedeira transformada **caracterizado** por compreender

- a) transformar uma célula hospedeira com o cassete de expressão recombinante de acordo com a reivindicação 21;
e
- b) cultivar dita célula hospedeira transformada sob as condições de crescimento celular.

23. Método de acordo com a reivindicação 22, **caracterizada** por ser uma célula de planta transformada.

24. Método de acordo com a reivindicação 22, **caracterizada** por ser uma célula de arroz, trigo, cana-de-açúcar, sorgo, milho, algodão, soja, alfafa, espinafre, tabaco, tomate, batata, girassol, canola, cevada ou milhete.

25. Método de obtenção de uma planta transformada **caracterizado** por compreender:

- a) transformar uma célula de planta com o cassete de expressão recombinante de acordo com a reivindicação 21;
- b) cultivar dita célula de planta transformada sob as condições de crescimento celular; e
- c) regenerar a planta transformada a partir da célula de planta transformada.

26. Método de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado** pelo fato de a planta ser arroz, trigo, cana-de-açúcar, sorgo, milho, algodão, soja, alfafa, espinafre, tabaco, tomate, batata, girassol, canola, cevada ou milhete.

FIGURA 1

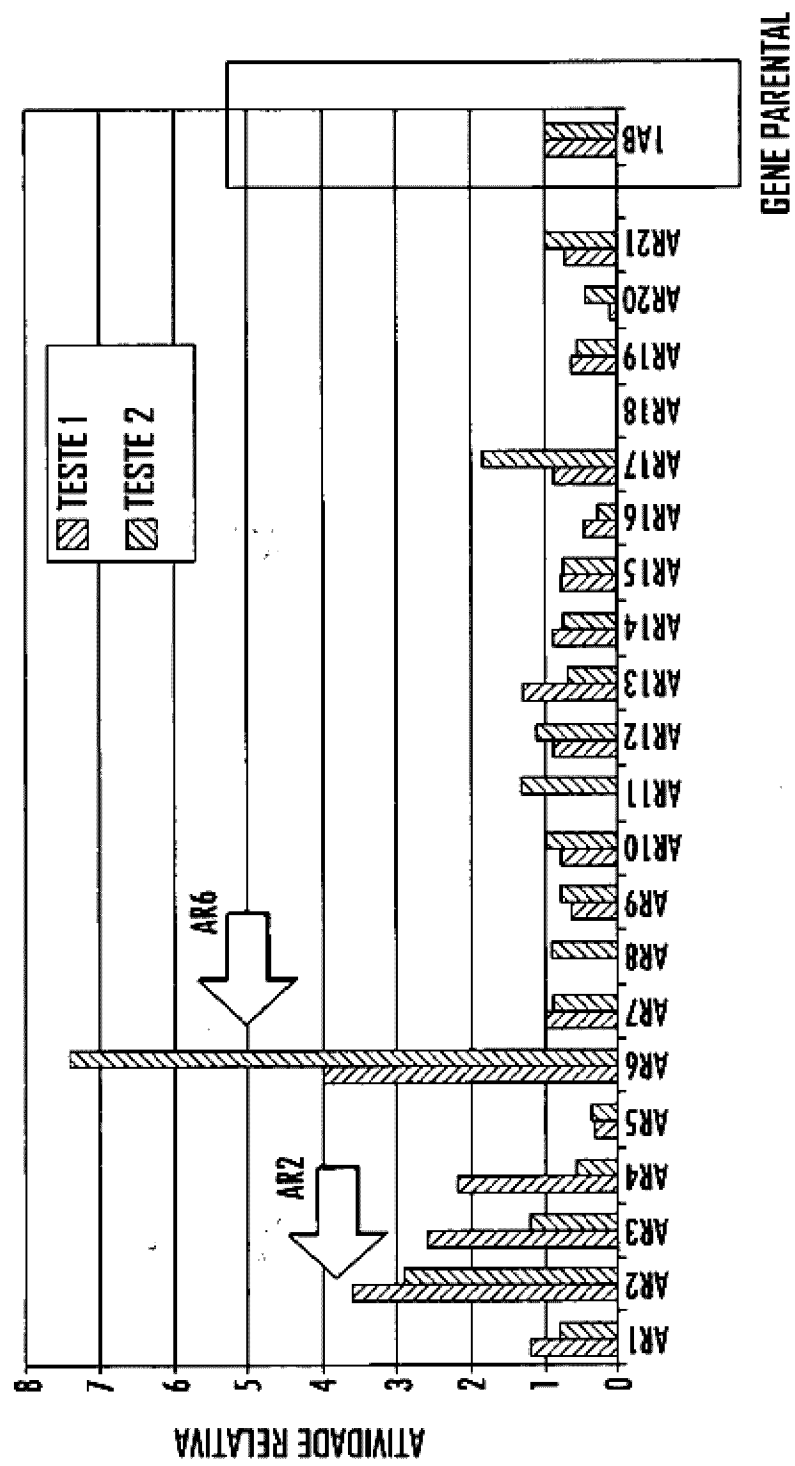


FIGURA 2

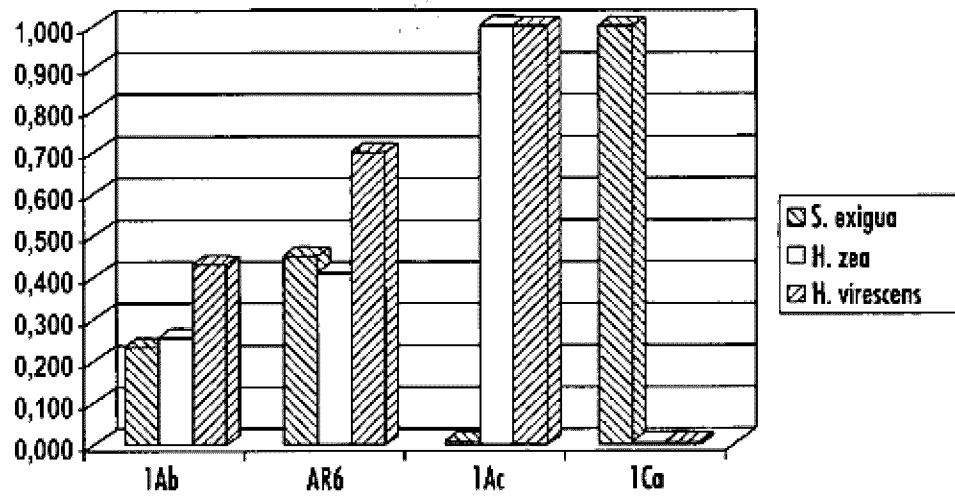
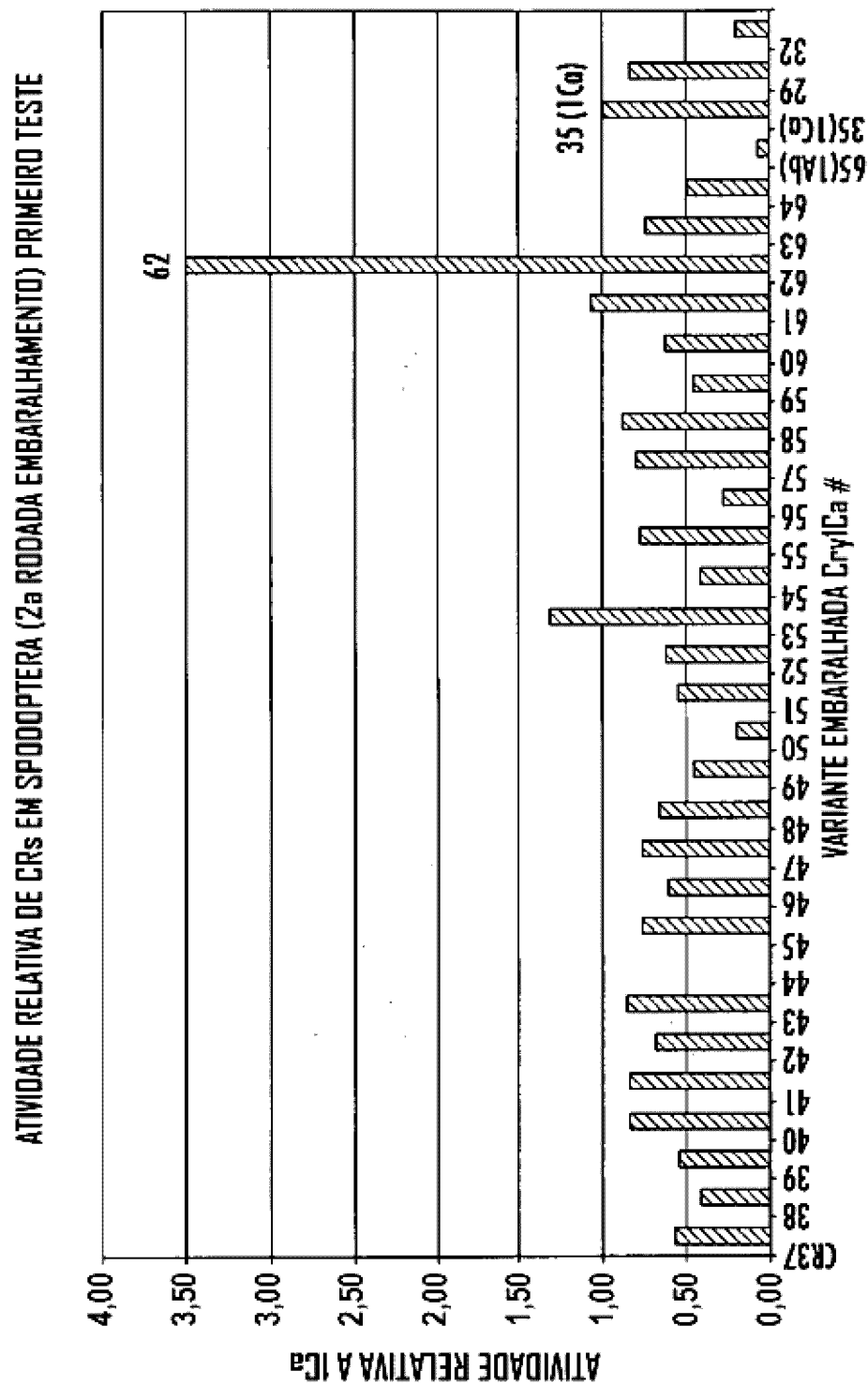


FIGURA 3



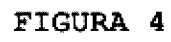


FIGURA 5A

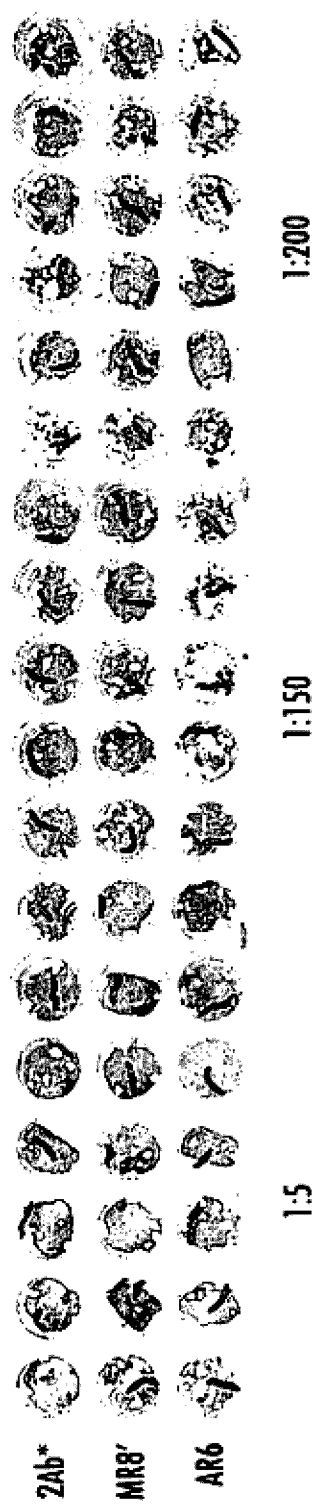


FIGURA 5B



FIGURA 6

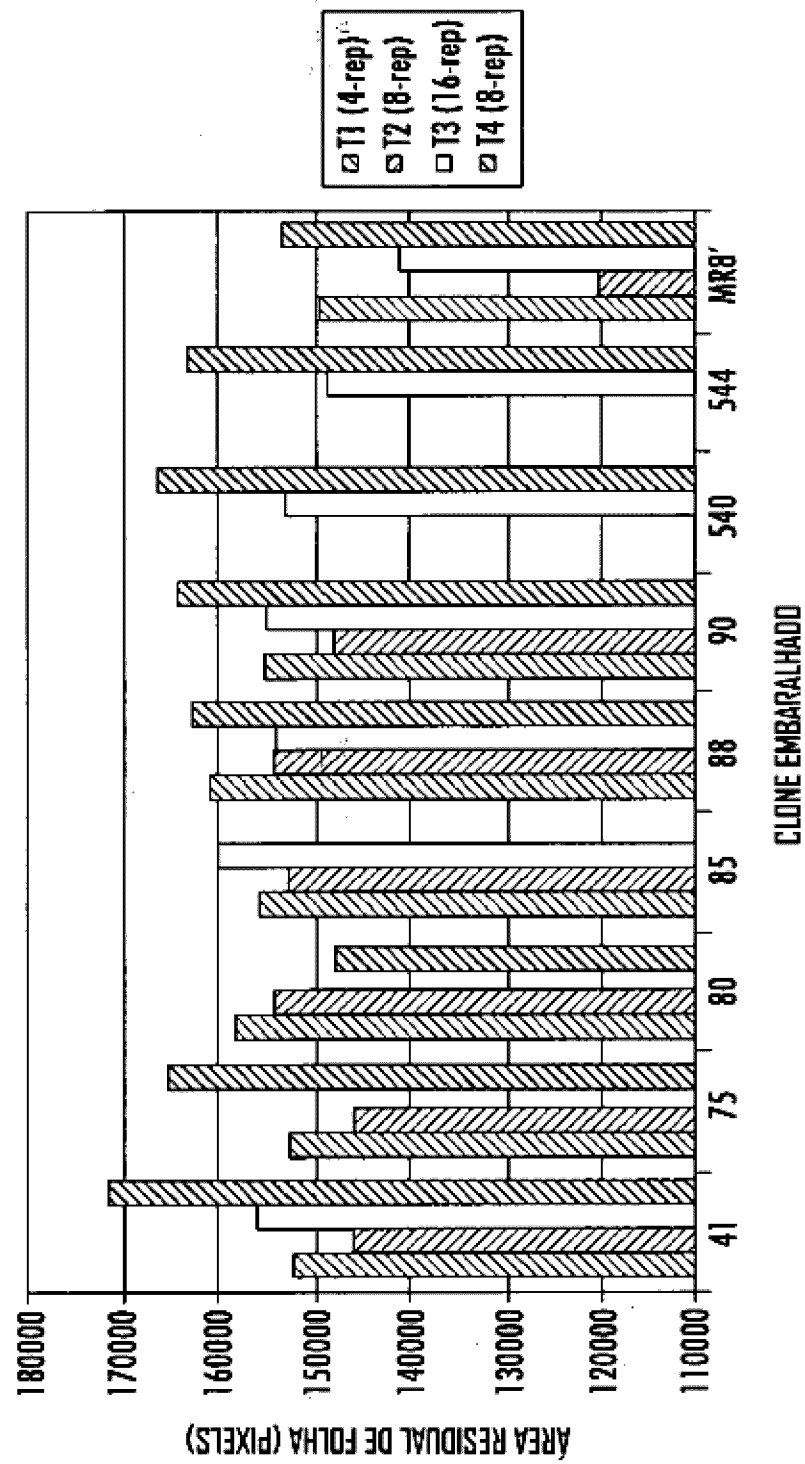


FIGURA 7

