



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

(21) **PI0614523-0 A2**



\* B R P I O 6 1 4 5 2 3 A 2 \*

(22) Data de Depósito: 02/08/2006  
(43) Data da Publicação: 29/03/2011  
(RPI 2099)

(51) *Int.Cl.:*  
G01N 33/53  
C12Q 1/70

(54) **Título: MÉTODO PARA IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS, POLINUCLEOTÍDEO, VETOR RECOMBINANTE, CÉLULA, PLANTA E MÉTODOS PARA SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS E PARA CONFERIR EM UMA PLANTA A CAPACIDADE DE RESISTIR À INFECÇÃO CAUSADA POR FUNGOS**

(57) **Resumo: MÉTODO PARA IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS, POLINUCLEOTÍDEO, VETOR RECOMBINANTE, CÉLULA, PLANTA E MÉTODOS PARA SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS E PARA CONFERIR EM UMA PLANTA A CAPACIDADE DE RESISTIR À INFECÇÃO CAUSADA POR FUNGOS. A presente invenção refere-se a um método para a identificação de peptídeos tendo uma afinidade para a superfície de fungos é provido, sendo este um método para identificação de peptídeos capazes de afetar o desenvolvimento de um fungo. Também são providas composições compreendendo peptídeos identificados usando-se o método da presente invenção. Em adição, polinucleotídeos isolados, vetores, cassetes de expressão e células transformadas, capazes de expressar peptídeos identificados pelo método da presente invenção, são providos.**

(30) Prioridade Unionista: 02/08/2005 US 60/704,933

(73) Titular(es): UNIVERSITY OF MISSOURI BOARD OF CURATORS

(72) Inventor(es): FRANCIS J. SCHIMIDT, GARY STACEY, JAMES T. ENGLISH, ZHIWEL FANG

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006030291 de 02/08/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/016680de 08/02/2007

MRPESLFTAV LFAASSALAA PUNTTTDEET RARFONNIE VSEIHTTLEL  
 NYLPPSNSTN NQMLFINTTI ESTLAKBEOV SLSEKLAAGT BALGNDAGR  
 WPSIALAIKI DGRLEPDSNA TANASTDFGN YTSALPAAVL YPSTCGVAL  
 LSAARSTPEW PTTTAPRGRG HSLAGQAFAP GGVVNMASH GDAAAPRIN  
 VSADGRYVDA GGRQVWIDRL RASLARGVAP LSWIDYLNLE VCCMLNAGE  
 SQQLPREGPD ISNVLEMDVI QNEMVYCS AQINRDLPEA VGGSEPCPV  
 YDARLYDQ KSLARWYEF VYTFAAESA DQFDTAPED GGGSEPCPV  
 SYVEGSPVFN QSLGELLANE GFTTADUAR DILLASERNA TQVYSIRAT  
 NXDMAIARA AVQQLASVL GWSYVEGFA EQPDVAYAAE LDRVIGESVA  
 LNKLGLEWVP HPHLDMFVPR DRLEDFRGGY PEGYLOTTDI UGSEVYPTN  
 KSKLDDGNEA ATPEEDVYFE YSLEFSVAP NDLARLQSON RRLRFDIA  
 QUQYKTYLAR HTRGSDVHE YELANWREY LALNKYDQEA ELSTGQVLE  
 KLADRFNSNP E

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODO PARA IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS, POLINUCLEOTÍDEO, VETOR RECOMBINANTE, CÉLULA, PLANTA E MÉTODOS PARA SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS E PARA CONFERIR EM UMA PLANTA A CAPACIDADE DE RESISTIR À INFECÇÃO CAUSADA POR FUNGOS"**.

Pedidos de Patente Relacionados

Este pedido de patente é uma continuação em parte do Pedido de Patente dos Estados Unidos Número de Série 09/829.549, depositado em 10 de abril de 2001, que reivindica o benefício de prioridade do Pedido de Patente Provisório dos Estados Unidos Número de Série 60/195.785, depositado em 10 de abril de 2000. Este pedido também reivindica benefício do Pedido de Patente Provisório dos Estados Unidos 60/704.933, depositado em 2 de agosto de 2005. Todos os pedidos antes mencionados são aqui incorporados por referência.

Listagem de Seqüência

Este pedido de patente é acompanhado por uma listagem de seqüência em uma forma legível de computador que reproduz precisamente as seqüências aqui descritas.

Antecedentes

A presente invenção refere-se ao uso de tecnologia de apresentação de fago para identificar peptídeos que se ligam a fungos patogênicos e, mais particularmente, a fungos patogênicos do gênero *Phytophthora*, *Phakopsora* e *Uromyces*. Bibliotecas de apresentação de fagos de peptídeos aleatórios são construídas usando-se oligonucleotídeos degenerados. O fago que expressa os peptídeos em sua superfície são contactados com fungos em diferentes estágios de vida, e aqueles fagos que se ligam são isolados, amplificados, e os peptídeos identificados. Uma vez identificados, os peptídeos podem ser selecionados para atividade antifungal e usados para identificar e caracterizar locais de ligação nos fungos.

*Phytophthora* é um organismo que causa doença economicamente importante nos Estados Unidos que causa grandes perdas em muitas espécies de colheita agronomicamente importantes. *Phytophthora sojae* é a segunda patogenia mais importante de sojas nos Estados Unidos. (Doupnik,

Plant Dis. 77:1170-1171). *Phytophthora capsici* tem uma ampla faixa de hospedeiro, e limitam mais notavelmente a produção de alto valor, colheitas de verdura solanácea. O controle destas patogenias é particularmente difícil, freqüentemente requerendo tratamento de campos totais com compostos biocidas. Embora eficaz, o interesse aumentado sobre o ambiente e custos econômicos de tais tratamentos requerem a necessidade de métodos de controle alternativos.

As espécies *Phytophthora* são parasitas forçados adaptados à sobrevivência de longo tempo na ausência de plantas hospedeiras. Oósporos ou quelamidoesporos existem em baixas densidades no solo, e capacitam à sobrevivência da patogenia. Na presença de uma planta susceptível, a patogenia progride rapidamente através de uma série de etapas de desenvolvimento finamente ajustadas que produzem ciclos de infecção e doença. O desenvolvimento de patogenia de oósporos ou quelamidoesporos através de liberação de zoósporo, enquistamento, germinação e infecção, parece seguir corretamente à primeira vista. Ainda, a progressão de estágios de vida é finamente ajustada a sinais ambientais, particularmente aqueles sinais provenientes de uma planta hospedeira.

Zoósporos é o estágio de vida de maior importância para dispersão a locais de infecção de raiz. Um local mais susceptível está localizado imediatamente atrás do meristema apical da raiz onde as células estão se alongando. Os exsudatos liberados de células de alongamento servem como sinais que dirigem movimento quimiotático de zoósporos em direção ao local (Carlile, em *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*, Erwin et al., eds., APS Press, 1983; Deacon and Donaldson, *Mycol. Res.* 97:1153-1171, 1993). A resposta quimiotática do zoósporo varia com a composição de exsudatos de raiz, e é específica de espécie. Por exemplo, zoósporos de *P. capsici*, *P. cactorum*, e outras espécies são atraídas a um arranjo de açúcares e aminoácidos (Hickman, *Phytopathology*, 60:1128-1135, 1970; Khew and Zentmyer, *Phytopathology*, 63:1511-1517, 1973), mas zoósporos de *P. sojae* são atraídos a compostos isoflanóides específicos (Norris et al., *Plant Physiol.*, 117:1171-1178, 1998). Embora o mecanismo preci-

so de quimioatração não seja conhecido, Deacon and Donaldson (*Mycol. Res.*, 97:1153-1171, 1993) e Carlile (em *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*, Erwin et al., eds., APS Press, 1983) resumiu experimentos que sugerem o envolvimento de quimiorreceptores na superfície do zoósporo.

Os zoósporos encistam-se à medida que eles se aproximam da superfície da raiz em resposta aos sinais ambientais. O encistamento de zoósporos de *P. palmivora* e outra espécie *Phytophthora*, por exemplo, pode ser influenciado pelas concentrações de íon de cálcio local (Griffith et al., *Arch. Microbiol.*, 149:565-571, 1988; Warburton and Deacon, *Fungal Genetics Biol.*, 25:54-62, 1998). O encistamento pode também ser induzido pela alta concentração de quimio-atradores ou por componentes de parede de célula de raiz. Por exemplo, os zoósporos de *P. sojae* encistam-se na presença de altas concentrações de compostos isoflavonóides de soja (Morris and Ward, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 40:17-22, 1992). Em contraste, zoósporos de *Pythium aphanidermatum* encistados quando em contato com resíduos de fucosil e galactosil de superfícies de célula de raízes de agrião (Longman and Callow, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 30:139-150, 1987; Estrada-Garcia et al., *J. Exp. Bot.* 41:693-699, 1990). Deacon and Donaldson (*Mycol. Res.*, 97:1153-1171, 1993) notaram que o encistamento na presença de altas concentrações de atradores seria pernicioso à infecção potencial, e, desse modo, selecionado contra o tempo. Eles sugerem, contudo, que atradores na superfície da raiz podem ser suficientemente concentrados para predispor zoósporos para encistar após contato com resíduos de superfície de raiz.

Quando em contato com uma raiz, os zoósporos encistam-se com uma orientação específica de modo que um tubo de germe emerge em direção a raiz. Se os zoósporos encistam-se antes do contato com a raiz, os tubos de germe emergirão em qualquer orientação, e devem reorientar de modo a localizar a raiz, e infectar a planta. Os receptores de superfície de célula no tubo de germe são pensados serem envolvidos neste processo de orientação de raiz. Morri et al., (*Plant Physiol.*, 117:1171-1178, 1998), por

exemplo, demonstraram uma resposta orientada de crescimento de cisto recentemente germinado de *P. sojae* para concentrações não-tóxicas baixas de compostos isoflavonóides derivados de soja. Zentmyer (*Science*, 133:1595-1596, 1091) reportou orientação hifal de *P. cinnamomi* em direção às raízes de hospedeiro, mas a natureza do(s) composto(s) atraidor(es) não foi definida.

Após infecção, o hifal cresce através de tecido de planta intercelularmente e/ou intracelularmente, dependendo da espécie de patogenicidade (Stossel et al., *Can. J. Bot.*, 58:2594-2601, 1980; Coffey and Wilson, em *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*, Erwin et al., APS Press, 1983; Enkerli et al., *Can. J. Bot.*, 75:1493-1508, 1997; Hardhan and Mitchell, *Fungal Gen. Biol.*, 24:252-284, 1998; Murdoch and Hardham, *Protoplasma*, 201:180-193, 1998). Haustoria são formadas por algumas espécies *Phytophthora*, incluindo *P. infestans* (Coffey and Wilson, em *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*, Erwin et al., eds., APS Press, 1983), *P. capsici* (Jones et al., *Phytopathology*, 64:1084-1090, 1974), e *P. sojae* (Stössel et al., *Can. J. Bot.*, 58:2594-2601, 1980). Ambos hifais e haustoria estabelecem contato estreito com as paredes e membranas de célula de hospedeiro. Presumivelmente, os receptores de superfície de célula na detecção de sinais de planta, embora evidência direta esteja carecendo. A evidência indireta de receptores de superfície de célula vem de observações tais como a ocorrência de vesículas na porção distal de haustoria (Coffey and Wilson, em *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*, Erwin et al., eds., APS Press, 1983). Heath (*Can. J. Bot.*, 73 (Suppl.):S131-S139, 1995) discutiu os eventos possíveis de crescimento de ponta de hifais fungais envolvendo comunicação com o ambiente circundante, via canal de íon e funções de vesícula.

Conforme discutido acima, a evidência aponta para a proeminência de receptores de superfície celular em disparo comportamental e etapas de desenvolvimento de *Phytophthora*. Os receptores de superfície de células, portanto, podem proporcionar um meio para romper desenvolvimento de patogenicidade e, desse modo, infectividade. Retardo ou rompimento de

desenvolvimento pode ter um impacto substancial, visto que os zoósporos têm somente um tempo limitado para localizar, contactar, e penetrar um local de infecção que está efetivamente se movendo com o crescimento da ponta da raiz. Esta limitação de tempo resulta a partir da susceptibilidade de mudança dos tecidos de raiz, visto que conforme os tecidos na região de alongamento maturam, eles se tornam significativamente susceptíveis a infecção (English and Mitchel, *Phytopathology*, 78:1478-1483, 1988).

"Fago de fusão" são vetores bacteriófagos filamentosos nos quais peptídeos estranhos e proteínas são clonados em um gene de revestimento de fago e revelados como parte de uma proteína de revestimento de fago. Os genes de revestimento comumente usados para a produção de fago de fusão são os gene pVIII e gene pIII. Cerca de 3900 cópias de pVIII compõem a porção maior do revestimento de proteína de virion tubular. Cada proteína de revestimento pVIII ocorre em um ângulo raso ao eixo longitudinal do virion, com seu terminal-C enterrado no interior perto do DNA, e seu terminal-N exposto ao ambiente externo. Cinco cópias da proteína de revestimento pIII estão localizadas na extremidade terminal de cada virion, e estão envolvidas na fixação do fago para pIII de *E. coli*, e para reagrupamento do vírus após infecção e replicação. Os peptídeos revelados como parte de pVI-  
II estão restritos na matriz de sua reprodução no revestimento de virion. Em contraste, os peptídeos revelados como parte de pIII são mais flexíveis devido à posição terminal das proteínas pIII. Fago específico pode ser construído para revelar peptídeos de seis a 15 aminos ácidos em comprimento. A inserção de oligonucleotídeos aleatórios ou degenerados nos genes de proteína de revestimento permite a produção de bibliotecas de peptídeo aleatórias reveladas por fago. Uma biblioteca de revelação típica contém 10 a 100 cópias a mais de  $10^8$  peptídeos de seqüência aleatória. Desse modo, a revelação do fago é útil para seleção de peptídeos raros com características de ligação desejadas.

As bibliotecas de peptídeo aleatórias preparadas por fago têm sido usadas para isolamento de ligantes para receptores de superfície de célula em células de mamíferos. Por exemplo, os peptídeos têm sido isola-

dos de bibliotecas preparadas por fago que ligam as glicoproteínas integrin de membrana envolvidas na matriz extracelular de célula e interações célula-célula (O'Neil et al., *Proteins*, 14:509-515, 1992; Smith et al., *J. Biol. Chem.*, 269:32788-32795, 1994; Healy et al., *Biochemistry*, 34:3948-3955, 5 1995). O fago preparou peptídeos de adesão de célula especificamente bloqueados para moléculas extracelulares definidas, e outras células (Koivunen et al., *J. Biol. Chem.*, 268:20205-20210, 1993; Koivunen et al., *J. Cell Biol.*, 124:373-380, 1994; Healy et al., *Biochemistry*, 34:3948-3955, 1995; Pasqualini et al., *Nature Biotech*, 15: 542-547, 1997). Bibliotecas de peptídeo por 10 preparação aleatória de fago têm também sido usadas para selecionar peptídeos que se distinguem entre tecidos de cérebro e de rim (Pasqualini e Ruoslahti, *Nature*, 380: 364-366, 1996). Seleção de afinidade *in vivo* de peptídeos aleatórios preparados por fago tem também sido usada para selecionar peptídeos que ligam seletividade a células endoteliais de vasos sangüíneos 15 de tecidos de tumor específicos (Pasqualini et al., *Nature Biotech*, 15: 542-547, 1997). Quando estes peptídeos foram fundidos em um fármaco anticâncer e injetados em camundongos que suportam tumor, os peptídeos atingem com sucesso o fármaco para vasos sangüíneos de tumor, e impedem o desenvolvimento progressivo do tumor (Arap et al., *Science*, 279: 377-380, 20 1998).

Os métodos de preparação de fago têm sido aplicados em patologia de planta em somente circunstâncias muito limitadas. Os métodos de preparação de fago têm sido usados quase exclusivamente para identificar anticorpos para diagnose de vírus de planta (Susi et al., *Phytopathology*, 25 88:230-233; 1998; Ziegler et al., *Phytopathology*, 88:1302-1305, 1998; Griep et al., *J. Plant Pathol.*, 105:147-156 1999; Toth et al., *Phytopathology*, 89:1015-1021, 1999). A preparação de fago foi usada em um exemplo simples para selecionar anticorpos com afinidade a epitopos de superfície exposta em cisto recentemente germinado e esporos de *Phytophthora infestans* (Gough et al., *J. Immunol. Methods*, 228:97-108, 1999). Fragmentos de 30 anticorpo de fragmento variável (Fv) de cadeia simples de fago isolado preparado não foram acessados para sua potência para influenciar o compor-

tamento de esporos ou cistos recentemente germinados. Os anticorpos foram testados para sua atividade antifungal com esporângio, mas foram verificados terem atividade antifungal não-detectável.

*Phakopsora pachyrhizi* é um fungo que causa uma doença de ferrugem de soja (*Glycines Max*). A patogenia se difundiu da Ásia para todas as outras regiões de produção de soja no mundo. *P. pachyrhizi* chegou aos Estados Unidos durante o final de 2004. No presente, não é conhecida resistência durável disponível em quaisquer variedades de soja. *Uromyces appendiculatus* é um fungo que causa ferrugem no feijão (*Phaseolus vulgaris*). Os produtores estão trabalhando para identificar genes no feijão que podem ser manipulados para resistência à ferrugem. Os produtores de soja dos Estados Unidos têm antecipado a chegada de *Phakopsora pachyrhizi*, o fungo que causa ferrugem à soja, visto sua ocorrência reportada no Brasil. A chegada de *P. pachyrhizi* nos Estados Unidos foi antecipada, e os fazendeiros devem agora responder a ocorrência anual potencial desta nova doença. Os fazendeiros interessados têm se baseado nos relatórios de perdas que variam de 10 a 80% em outras regiões do mundo quando medições de controle não foram implementadas com sucesso.

Os produtores de soja foram preocupados porque resistência natural não-durável a ferrugem foi descoberta após testar mais do que 18.000 variedades de soja dos Estados Unidos, e a patogenia, *P. pachyrhizi* pode infectar potencialmente qualquer cultivar produzido. Na antecipação da chegada da patogenia de ferrugem, uma grande quantidade de pesquisa foi conduzida para identificar fungicidas eficazes, e liberação governamental de emergência para aplicação a soja foi obtida. Seleção tradicional e métodos de produção têm identificado genes de resistência não maior às patogenias antes mencionadas, e, particularmente, no caso de *U. appendiculatus* e *P. pachyrhizi*.

Os fungicidas, do mesmo modo, serão a linha de frente de defesa por muitos anos até que novos genes de resistência ou outras formas de resistência sejam identificados.

Os fungicidas não têm sido tradicionalmente usados em muita

produção de soja. Conseqüentemente, existe informação limitada concernente aos custos desta prática de controle de doença e sua viabilidade igualmente econômica. Estes interesses têm conduzido a estimativas variáveis da área medida em acres no Missouri e outros estados que podem ser alterados de soja para colheitas alternativas.

Para proteger os fazendeiros de soja e assegurar que encontrem as necessidades nacionais, alternativas a fungicidas devem ser desenvolvidas o mais rapidamente possível. Esta descrição proporciona um novo tipo de resistência à ferrugem baseada em biotecnologia. A tecnologia envolve o desenvolvimento e desdobramento de peptídeos de defesa em plantas transgênicas, tais como sojas. A tecnologia similarmente impacta patogenia de ferrugem de soja de campo importante (*Phaseolus vulgaris*), *Uromyces appendiculatus*.

Como fungos de indução de ferrugem, *U. appendiculatus* e *P. pachyrhizi* pertencem à ordem Uredinales, dentro da classe Basidiomycetes. *U. appendiculatus* produz cinco estágios de esporos em uma planta de hospedeiro simples. *P. pachyrhizi* reproduz predominantemente por uredoesporos em uma planta de hospedeiro simples. Uredoesporos são responsáveis pela difusão rápida do fungo. *P. pachyrhizi* pode infectar número indeterminado de espécies de legumes, em adição à soja.

Uredoesporos de *U. appendiculatus* penetram através das aberturas estomatais foliares. *P. pachyrhizi* difere em que uredoesporos germinados penetram diretamente através da camada de célula epidermal da folha. Tipicamente, um uredoesporo que se aterra em uma superfície de folha germina para produzir uma almofada de infecção (appressorium) que adere à superfície. Em ambas as espécies, o appressorium produz uma hifa com ponta hifal que penetra a planta. Após penetração, cada fungo desenvolve estrutura similar à rosca (hifa) que cresce intercelularmente através dos tecidos de folha. Os hifais entram nas células de hospedeiro sem matá-las. Ali, elas produzem estruturas esféricas (haustoria) que extraem nutrientes a partir das células de folha vivas. Logo após, a infecção de cada fungo forma uredia que produz esporos adicionais.

As bibliotecas de preparação de fago combinatoriais proporcionam uma vasta ordem de peptídeos aleatórios dos quais selecionam ligantes dirigidos a proteínas de interesse (O'Neil et al., 1992). As bibliotecas de peptídeo de preparação de fago são misturas de clones de fago filamentosos, cada um dos quais revelando uma seqüência de peptídeo estranha simples na superfície do virion (Cwerla, 1990; Scott e Smith, 1990). O peptídeo revelado é fisicamente ligado com seu DNA de codificação no genoma de fago. Desse modo, o peptídeo pode ser facilmente e rapidamente identificado, e transferido para outros vetores ou sistemas de preparação. Bibliotecas típicas contêm  $10^9$  variantes aleatórias de peptídeo.

As bibliotecas aleatórias de peptídeo são úteis para isolamento de ligantes de importância para moléculas de superfície de células de células de mamífero. Por exemplo, peptídeos com afinidade para glicoproteínas de transmembrana, integris, foram isolados de bibliotecas de bioclassificação contra moléculas purificadas (O'Neil et al., 1992; Smith et al., 1994; Healy et al., 1995). Alguns peptídeos foram encontrados para bloquear a adesão de célula para moléculas extracelulares definidas, e para outras células. A eficiência de ligação de peptídeo e inibição foi específica para motivo de seqüência de peptídeo (Koivunen et al., 1993; Koivunen et al., 1994; Healy et al., 1995; Pasqualini et al., 1995), e a eficiência de seleção foi específica para tecidos de órgão particulares (Pasqualini e Ruoslahti, 1996).

O que é necessário, portanto, é um método rápido e eficiente para seleção de peptídeos para ligação específica a patogenicias de planta. Uma vez identificados, os peptídeos podem ser adicionalmente avaliados por sua capacidade de impedir infecção de plantas pela patogenia, e peptídeos adequados podem ser aplicados diretamente à planta, usados para tratar o solo, ou, alternativamente, seqüências que codificam os peptídeos podem ser introduzidas nas plantas para conferir imunidade ou resistência contra a patogenia. Dessa maneira, métodos econômicos e ambientalmente seguros e eficazes de controlar patogenicias de planta podem ser desenvolvidos.

### Sumário

A presente invenção supera os problemas esboçados acima, e é um avanço na técnica pela provisão de resistência às patogenias em plantas. Em um aspecto, as sojas são tornadas resistentes à ferrugem de soja onde resistência não-durável é atualmente disponível. Em outro exemplo, as mesmas técnicas gerais podem proporcionar *Phaseolus vulgaris* que é resistente à ferrugem comum.

Em um exemplo, um método para identificação de peptídeos tendo uma afinidade para a superfície de uma patogenia de planta. Neste método, uma biblioteca é construída para incluir peptídeos aleatórios pela provisão de peptídeos que codificam oligonucleotídeos degenerados. Os oligonucleotídeos são inseridos em um vetor apropriado que expressa os peptídeos codificados em sua superfície, e é capaz de transfectar uma célula hospedeira. Uma célula hospedeira é transfectada com o vetor em uma forma infecciosa para criar uma biblioteca de peptídeos no vetor. O vetor que expressa a biblioteca de peptídeo é, em seguida, contactada com uma patogenia-alvo, e permitida se ligar à patogenia. O vetor não-ligado é removido, e o vetor que se ligou à patogenia eluiu. O vetor eluído é, em seguida, amplificado em uma célula hospedeira adequada, e os oligonucleotídeos inseridos isolados. Os oligonucleotídeos são, em seguida, seqüenciados por qualquer método adequado, e a seqüência de aminoácido deduzida a partir da seqüência dos oligonucleotídeos.

Um aspecto das instrumentalidades descritas se refere a peptídeos, e aos meios para sua seleção, como nova soja e fatores de resistência de feijão. Os peptídeos são vantajosamente identificados e selecionados sem qualquer conhecimento de alvos de patogenicidade específicos na patogenia. Desde que estes peptídeos não ocorrem necessariamente em soja ou feijão na natureza, a patogenia não foi exposta a eles antes. Conseqüentemente, a eficiência de peptídeos desenvolvidos em soja e feijão pode ser ampla através de populações de patogenia diversas, e a eficiência, do mesmo modo, será durável.

Métodos tradicionais de seleção de peptídeo por preparação de fago são baseados na classificação de bibliotecas contra moléculas purifica-

das de interesse específico, por exemplo, conforme mostrado em Barbas et al., 2001. A presente metodologia difere das técnicas anteriores, em que a seleção da biblioteca contra células totais não requer conhecimento anterior de um alvo específico, ou altas concentrações da molécula-alvo purificada.

5           Em um aspecto de o que é mostrado, moléculas pequenas conhecidas como peptídeos podem proporcionar resistência à ferrugem em plantas transformadas quando reveladas como parte de esqueleto das proteínas. Em um exemplo, estes peptídeos podem ser selecionados de acordo com as instrumentalidades descritas aqui pela afinidade de ligação para estruturas infectivas de cistos recentemente germinados, isto é, esporos germinados, de *U. appendiculatus* e *P. pachyrhizi*. Esta afinidade de ligação pode inibir desenvolvimento adicional e patogênese dos esporos. Os peptídeos são, conseqüentemente, mostrados para inibir patogênese destes fungos. Em um exemplo particular, citokinin oxidase pode ser modificada para servir como um esqueleto da proteína para preparação de peptídeos selecionados em plantas.

10

15

Com o tempo, as populações de patogenia podem ser capazes de se adaptar à presença de um peptídeo de conferência de resistência selecionada. Contudo, dada a facilidade de seleção e classificação de peptídeo, um novo peptídeo de defesa pode ser selecionado rapidamente para encontrar o desafio de mudança das populações de patogenia. Vantagens particulares das instrumentalidades descritas incluem velocidade e simplicidade de processo de seleção de peptídeo e avaliação de fenótipo, a seleção de peptídeo não requer conhecimento de alvos de patogenicidade em uma patogenia, uma alta percentagem de recuperação de peptídeos eficazes, uma capacidade de identificar rapidamente novos peptídeos de defesa em demanda, uma capacidade de desdobrar esqueletos de peptídeos em tecidos de planta susceptíveis, e uma capacidade de modificar construtos de esqueleto de peptídeo rapidamente em demanda.

20

25

30           Outro aspecto proporciona uma composição antifungal compreendendo pelo menos um peptídeo selecionado a partir do grupo consistindo em ADPPRTVST (SEQ ID NO:7), ADRPSMSPT (SEQ IDO NO:8), A-

DITDPMGA (SEQ ID NO:20), AVGTHTPDS (SEQ ID NO:21), AVSPNVHDG (SEQ ID NO:22), LTRCLVSTEMAARRP (SEQ ID NO:24), EFRKNYPSAA-PLIPR (SEQ ID NO:31), LFXCYPPCTYSYCLS (SEQ ID NO:33), e AAP-DLQDMA (SEQ ID NO:4).

5 Ainda outro aspecto é um nucleotídeo recombinante compreendendo uma seqüência de codifica um peptídeo selecionado a partir do grupo consistindo em ADPPRTVST (SEQ ID NO:7), ADRPSMSPT (SEQ ID NO:8), ADITDPMGA (SEQ ID NO:20), AVGTHTPDS (SEQ ID NO:21), AVSPNVHDG (SEQ ID NO:22), LTRCLVSTEMAARRP (SEQ ID NO:24), E-  
10 FRKNYPSAAPLIPR (SEQ ID NO:31), LFXCYPPCTYSYCLS (SEQ ID NO:33), e AAPDLQDAM (SEQ ID NO:4).

Ainda outro aspecto é um vetor recombinante compreendendo uma seqüência de nucleotídeo que codifica um peptídeo selecionado a partir do grupo consistindo em ADPPRTVST (SEQ ID NO:7), ADRPSMSPT (SEQ  
15 ID NO:8), ADITDPMGA (SEQ ID NO:20), AVGTHTPDS (SEQ ID NO:21), AVSPNVHDG (SEQ ID NO:22), LTRCLVSTEMAARRP (SEQ ID NO:24), EFRKNYPSAAPLIPR (SEQ ID NO:31), LFXCYPPCTYSYCLS (SEQ ID NO:33), e AAPDLQDAM (SEQ ID NO:4).

Um outro aspecto é uma célula transformada com um vetor  
20 compreendendo uma seqüência de nucleotídeo que codifica um peptídeo selecionado a partir do grupo consistindo em ADPPRTVST (SEQ ID NO:7), ADRPSMSPT (SEQ ID NO:8), ADITDPMGA (SEQ ID NO:20), AVGTHTPDS (SEQ ID NO:21), AVSPNVHDG (SEQ ID NO:22), LTRCLVSTEMAARRP (SEQ ID NO:24), EFRKNYPSAAPLIPR (SEQ ID NO:31), LFXCYPPCTYSY-  
25 CLS (SEQ ID NO:33), e AAPDLQDAM (SEQ ID NO:4).

Em ainda outro aspecto é provido um cassete de expressão compreendendo como componentes operativamente ligados, um promotor; uma seqüência de nucleotídeo que codifica um peptídeo selecionado a partir do grupo consistindo em ADPPRTVST (SEQ ID NO:7), ADRPSMSPT (SEQ  
30 ID NO:8), ADITDPMGA (SEQ ID NO:20), AVGTHTPDS (SEQ ID NO:21), AVSPNVHDG (SEQ ID NO:22), LTRCLVSTEMAARRP (SEQ ID NO:24), EFRKNYPSAAPLIPR (SEQ ID NO:31), LFXCYPPCTYSYCLS (SEQ ID

NO:33), e AAPDLQDAM (SEQ ID NO:4); e uma seqüência de sinal de terminação de transcrição.

Um aspecto adicional proporciona uma planta recombinante compreendendo um cassete de expressão compreendendo um promotor; uma seqüência de nucleotídeo que codifica um peptídeo selecionado a partir do grupo consistindo em ADPPRTVST (SEQ ID NO:7), ADRPSMSPT (SEQ ID NO:8), ADITDPMGA (SEQ ID NO:20), AVGTHTPDS (SEQ ID NO:21), AVSPNVHDG (SEQ ID NO:22), LTRCLVSTEMAARRP (SEQ ID NO:24), EFRKNYPSAAPLIPR (SEQ ID NO:31), LFXCYPPCTYSYCLS (SEQ ID NO:33), e AAPDLQDAM (SEQ ID NO:4); e uma seqüência de sinal de terminação de transcrição.

Outro aspecto proporciona um método para caracterização de peptídeos tendo uma afinidade para a superfície de patogenicias de planta compreendendo provisão de uma biblioteca de peptídeos aleatórios produzidos pela provisão de peptídeos que codificam oligonucleotídeos degenerados; inserção dos oligonucleotídeos em um vetor apropriado que expressa os peptídeos em sua superfície e é capaz de transfectar uma célula hospedeira; e transfecção de uma célula hospedeira apropriada com o vetor para amplificar o vetor em uma forma infecciosa para criar uma biblioteca de peptídeos no vetor. O vetor que expressa a biblioteca de peptídeo é, em seguida, contactado com uma patogénia de planta de interesse, e o vetor permitido se ligar à patogénia. Após ligação, o vetor não-ligado é removido e o vetor ligado eluído a partir da patogénia. O vetor eluído é amplificado em uma célula hospedeira adequada, e os oligonucleotídeos inseridos nos vetores eluídos isolados. Os peptídeos codificados pelos oligonucleotídeos são, em seguida, produzidos, contactados com as patogenicias de planta de interesse, e o efeito de infectividade observado. Em uma concretização, os oligonucleotídeos isolados são seqüenciados, as seqüências de aminoácido dos peptídeos deduzidas da seqüência de nucleotídeo, e os peptídeos produzidos pela síntese química. Em outra concretização, os peptídeos são produzidos pela inserção dos oligonucleotídeos isolados em um vetor de expressão que é usado para transformar uma célula hospedeira adequada. As cé-

lulas hospedeiras transformadas são então mantidas sob condições adequadas para expressão dos peptídeos.

Bibliotecas combinatoriais têm também sido selecionadas contra intacto de células para recuperação de peptídeos que se ligam a populações de proteínas de superfície não-definidas. Os peptídeos recuperados por este tipo de seleção podem ser avaliados para um fenótipo de interesse. Por exemplo, selecionou-se peptídeos com afinidade para zoósporos móveis da patogenicidade de planta oomicete, *Phytophthora*. As seleções de fenótipo produzem uma subcoleção de peptídeos que rompe o desenvolvimento normal por indução de encistamento prematuro dos esporos (Bishop-Hurley et al., 2002). Também mostrou-se que peptídeos selecionados para afinidade rompem o desenvolvimento de zoósporo quando preparados, ou em formato de preparação de fago, ou quando sintetizados como moléculas livres (Laskey et al., 2001; Bishop-Hurley et al., 2002).

#### 15 Breve Descrição dos Desenhos

Estas e outras características, aspectos, e vantagens, tornar-se-ão melhores compreendidas com relação à seguinte descrição, reivindicações em anexo, e figuras acompanhantes, onde:

20 A figura 1 mostra a organização de seqüências de peptídeo f8 em seis famílias. À esquerda estão os dendogramas e à direita estão os nomes e seqüências dos peptídeos.

A figura 2 mostra encistamento de zoósporos de *P. capsici* em resposta ao contato com os peptídeos preparados por fago f8 indicados nas várias concentrações dadas. Os valores de percentagem representam a média de dois experimentos. A percentagem de encistamento para controle da população de zoósporo que não contém fago varia entre 0 e 10%.

A figura 3 mostra encistamento de zoósporos de *P. capsici* em resposta ao contato com os peptídeos preparados por fago f8 e f88 indicados nas várias concentrações dadas.

30 A figura 4 mostra ligação dos peptídeos preparados por fago indicados para zoósporos de *P. capsici*. Os valores representam a média de três experimentos.

A figura 5 mostra a especificidade de ligação dos peptídeos preparados por fago indicados para *P. capsici*. Os valores representam a média de três experimentos.

A figura 6 é um mapa de plasmídeo pJE-7. AOX-P é o promotor de álcool oxidase, Mat- $\alpha$  é a seqüência secretória mat- $\alpha$ , CKX1 é a citoquina oxidase de seqüência 1, Pc87 é um peptídeo exemplar, e AOX-TT é a seqüência de terminação de álcool oxidase. Abaixo do mapa está a seqüência de filamento duplo que codifica Pc87 mostrando o filamento (+) (5' AG CTA GCA GAT AGA CCA TCA ATG TCA CCA ACA TAG T 3', SEQ ID NO:46), e o filamento (-) (5' CT AGA CTA TGT TGG TGA CAT TGA TGG TCT ATC TGT T 3', SEQ ID NO:47).

A figura 7 mostra a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:48) do inserto exemplar contido em pJE-7, onde os nucleotídeos sublinhados são a seqüência secretória mat- $\alpha$  (clivagem pela enzima Kex2 ocorre após a última arginina sublinhada), seguido pela citoquina oxidase de seqüência 1. Os dois aminoácidos sublinhados duplos (KL) foram adicionados para auxiliar na construção da proteína de fusão. A seqüência de aminoácido do peptídeo exemplar Pc87 é mostrada em tipo negrito.

A figura 8 é um diagrama esquemático de processo mostrando um método para identificação de peptídeos de defesa de planta que podem ser usados para transformar planta, e conceder resistência à patogenicias de ferrugem.

A figura 9 mostra encistamento de zoósporos ao redor da região apical de uma citoquina oxidase de secreção de raiz transformada (CKX) que revela um peptídeo selecionado por afinidade (esquerda), e modelo de encistamento de zoósporo normal ao redor de uma ponta de raiz tipo selvagem (direita).

A figura 10 mostra inibição de crescimento de cisto recentemente germinado de *U. appendiculatus* por clone 19 de peptídeo de fago selecionado por afinidade (SEQ ID 50, tabela 3) (esquerda), e germinação e crescimento de uredoesporo normal na presença de biblioteca de fago não-selecionada (direita).

### Definições

"Seqüência de secreção" significa uma seqüência que direciona secretórios recentemente sintetizados ou proteínas de membrana para e através das membranas do retículo endoplasmático, ou a partir do citoplasma para o periplasma através da membrana interna de bactéria, ou a partir da matriz de mitocôndria no espaço interno, ou a partir do estroma de cloroplastos no tilacóide. A fusão de tal seqüência a um gene que é para ser expresso em um hospedeiro heterólogo assegura secreção da proteína recombinante a partir da célula hospedeira.

10 "Germiling" significa um cisto recentemente germinado (5-8 horas pós-germinação) que suporta um tubo de germe emergente.

"TBS" significa solução salina Tris-tamponada (50 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM de NaCl).

Um "polinucleotídeo recombinante" significa um polinucleotídeo que está livre de uma ou ambas das seqüências de nucleotídeo que flanqueia o polinucleotídeo no genoma que ocorre naturalmente do organismo do qual o polinucleotídeo é derivado. O termo inclui, por exemplo, um polinucleotídeo ou fragmento deste, que é incorporado em um vetor ou cassete de expressão; em um plasmídeo ou vírus que se replica autonomamente; no DNA genômico de um procariota ou eucariota; ou que existe como uma molécula separada independente de outros polinucleotídeos. Ele também inclui um polinucleotídeo recombinante que é parte de um polinucleotídeo híbrido, por exemplo, uma codificação de uma seqüência de polipeptídeo.

"IPTG" é isopropiltiogalactoside.

25 "TU" significa unidade de transdução.

"Tampão de NAP" é 80 mM de NaCl, 50 mM de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , pH ajustado para 7,0 com  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

"NZY-1c" é um meio de crescimento bacterial contendo 1% de NZ amina A (um meio tipo typtone; Humko-Sheffield Chemical, Norwich, N.Y), 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl, pH 7,0 ajustado com NaOH.

"PCR" significa reação em cadeia de polimerase.

Conforme aqui usado, "polinucleotídeo" e "oligonucleotídeo" são usados intercambiavelmente, e se referem a uma forma polimérica (2 ou mais monômeros) de nucleotídeos de qualquer comprimento, ou ribonucleotídeos ou deoxirribonucleotídeos. Embora os nucleotídeos sejam usualmente unidos por ligações de fosfodiéster, o termo também inclui nucleotídeos poliméricos contendo ligações de suporte de amida neural compostas de unidades de aminoetil glicina. Este termo se refere somente à estrutura primária da molécula. Desse modo, este termo inclui DNA ou RNA de filamento duplo e simples. Ele também inclui tipos conhecidos de modificações, por exemplo, etiquetas, metilação, "capas", substituição de um ou mais dos nucleotídeos que ocorrem naturalmente com um análogo, modificações de internucleotídeo, tais como, por exemplo, aqueles com ligações não-carregadas (por exemplo, fosfonatos de metila, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc), aqueles contendo porções pendentes, tais como, por exemplo, proteínas (incluindo, por exemplo, nucleases, toxinas, anticorpos, peptídeos de sinal, poli-L-lisina, etc), aqueles com intercalantes (por exemplo, acridina, psoralen, etc), aqueles contendo quelantes (por exemplo, metais, metais radioativos, boro, metais oxidativos, etc), aqueles contendo alquilantes, aqueles com ligações modificadas (por exemplo, ácidos nucléicos alfa anoméricos, etc), bem como formas não-modificadas do polinucleotídeo. Os polinucleotídeos incluem ambas as cepas de sentido e anti-sentido.

"Seqüência" significa a ordem linear na qual monômeros ocorrem em um polímero, por exemplo, a ordem de aminoácidos em um polipeptídeo, ou a ordem de nucleotídeos em um polinucleotídeo.

"Peptídeo", "Proteína" e "Polipeptídeo" são usados intercambiavelmente, e significam um composto que consiste em dois ou mais aminoácidos que são ligados por meio de ligações de peptídeo.

"Proteína recombinante" significa que a proteína, se compreendendo uma seqüência de aminoácido primária nativa ou mutante, é obtida por expressão de um gene transportado por uma molécula de DNA recombinante em uma célula outra que a célula na qual este gene e/ou proteína é naturalmente encontrado. Em outras palavras, o gene é heterólogo ao hos-

pedeiro no qual ele é expresso. Deve ser notado que qualquer alteração de um gene, incluindo a adição de um polinucleotídeo que codifica uma porção de purificação de afinidade, produz este gene não-natural para a proposta desta definição, e, desse modo, este gene não pode ser "naturalmente" encontrado em qualquer célula.

Um "peptídeo não-imunoglobulínico" significa um peptídeo que não é uma imunoglobulina, uma região reconhecida de uma imunoglobulina, ou contém uma região de uma imunoglobulina. Por exemplo, uma região variável de cadeia simples de uma imunoglobulina seria excluída desta definição.

"Substancialmente puro" ou "substancialmente purificado" significa que a substância está livre de outras proteínas contaminantes, ácidos nucleicos, e outros biológicos derivados a partir do organismo fonte original. A pureza pode ser ensaiada por métodos padrão, e ordinariamente serão pelo menos cerca de 40% puro, mais ordinariamente pelo menos cerca de 50% puro, geralmente pelo menos cerca de 60% puro, mais geralmente ordinariamente pelo menos cerca de 70% puro, freqüentemente pelo menos cerca de 75% puro, mais freqüentemente pelo menos cerca de 80% puro, tipicamente pelo menos cerca de 85% puro, mais tipicamente pelo menos cerca de 90% puro, preferivelmente pelo menos cerca de 95% puro, mais preferivelmente pelo menos cerca de 98% puro, e em concretizações ainda mais preferidas, pelo menos cerca de 99% puro. A análise pode ser em percentagem em peso e molar, avaliada, por exemplo, por espectrofotometria de manchamento de gel, ou etiquetação terminal, etc.

#### 25 Descrição Detalhada

A seguinte descrição detalhada é provida para auxiliar aqueles versados na técnica na prática das presentes instrumentalidades. Ainda assim, esta descrição detalhada não deve ser construída para limitar indevidamente a presente invenção, visto que modificações e variações nas concretizações aqui discutidas podem ser feitas por aqueles versados na técnica sem fugir do espírito ou escopo da presente invenção.

Todas as publicações, patentes, pedidos de patente, base de

dados e outras referências citadas neste pedido de patente, são aqui incorporados por referência em sua totalidade, como se cada publicação individual, patente, pedido de patente, base de dados, ou outra referência fossem específica e individualmente indicados para serem incorporados por referência.

5  
10  
15  
20  
25  
30

Existe um interesse crescente entre os produtores de soja que *P. pachyrhizi*, a causa de ferrugem de soja, entre e se difunda através das áreas de produção norte americanas no futuro próximo. O interesse ocorre de estimativas de perda de colheita de mais do que 50% em algumas regiões do mundo. Interesses a cerca desta doença têm aumentado com a recente descoberta do fungo de ferrugem no Brasil acima de 5 graus de latitude norte. É, do mesmo modo, que no futuro próximo, os esporos de *P. pachyrhizi* serão conduzidos pelos ventos que prevalecem em direção ao norte nos Estados Unidos (Rizvi, 2004). Devido a existirem genes de resistência à doença conhecidos eficazes contra ferrugem, os planos de controle de doença atuais estão nas aplicações repetidas de fungicida protetor, a revelação abaixo proporcionando uma opção adicional, que é usar novas tecnologias de peptídeo para identificar e distribuir peptídeos de defesa que se ligam às estruturas infectivas de *P. pachyrhizi* e patogenias de ferrugem relacionadas para parar o desenvolvimento da ferrugem. Os peptídeos de defesa podem ser designados para expressão em plantas e distribuídos em locais de infecção e colonização de patogenia. Planta, tal como soja e feijão de campo, pode ser projetada para expressar estes peptídeos para produzir linhas de plantas que são unicamente resistentes à ferrugem.

Um programa de desenvolvimento, conseqüentemente, identifica peptídeos que se ligam à esporos de *P. pachyrhizi* infectivos e cistos recentemente germinados, avalia a eficiência de peptídeos de ligação para inibição de germinação de esporo e crescimento fungal, incorpora e testa peptídeos de defesa candidatos em plantas para potencial de resistência.

A patogenia de ferrugem produz esporos (urediniosporos) que infectam folhas de soja, hastes e conjuntos de semente. Os esporos são soprados pelo vento e caem na planta onde eles germinam para produzir um

tubo de germe (definido como a fase de cisto recentemente germinado) que penetra os tecidos da planta. Após penetração, o fungo se desenvolve adicionalmente pela produção de um crescimento filamentoso que se espalha inter e intracelularmente através dos tecidos (Bonde et al., 1976; Koch e Hoppe, 1988). Com o tempo, a colonização do tecido conduz a produção de esporos infectivos adicionais que são liberados no vento, e movidos para outras plantas.

Embora alguns genes de resistência para ferrugem de soja sejam hipotetizados, muitos têm falhado sob as condições de campo, ou nos testes de inoculação em estufa. Uma vez que a patogenia chega em uma nova área geográfica, os cultivadores se vêem de frente com uma situação em que não existe virtualmente nenhuma resistência à ferrugem disponível em cultivares de soja comerciais, ou linhas de produção. Para o futuro previsível, os cultivadores necessitarão aplicar fungicidas periodicamente através de cada estação de crescimento.

A descoberta de novos genes de resistência em soja ou relativos próximos usando tecnologias convencionais, e a incorporação de tais genes em linhas de soja comerciais, é esperada requerer alguns anos. A descrição seguinte vantajosamente acelera este processo. Estas possibilidades seguem de avanços recentes na tecnologia de peptídeo, tecnologia de transformação de planta, e biologia molecular, que foram combinadas para o avanço aqui descrito. A tecnologia de peptídeo combinatorial capacita a seleção de coleções diversas massivas para aquelas que se ligam às estruturas infectivas de patogenias de planta, e rompem seu desenvolvimento antes e durante infecção da planta. Ferramentas de biologia molecular e transformação de planta capacitam a construção de sistemas de distribuição para expressar estes peptídeos de defesa em locais de infecção em plantas.

Os polipeptídeos de defesa podem ser definidos como aqueles que se ligam à estruturas infectivas, por exemplo., esporos de patogenias de planta e de animal para interromper o desenvolvimento da patogenia. Os peptídeos que se ligam e interrompem ou param a função de patogenia alcançam este efeito pela ligação às proteínas de superfície de patogenia que

são importantes na regulação do desenvolvimento. Uma proteína de superfície selecionada para este uso pode, por exemplo, ser uma enzima que é necessária para formação de parede de célula e crescimento vegetativo ou talvez, uma proteína que controla o impedimento de minerais que são críticos para crescimento. Os métodos aqui descritos, por meio de ilustração, podem selecionar eficazmente patogenias contra coleções diversas de peptídeo que contêm um bilhão ou mais de combinações aleatórias de peptídeo. A técnica é especificamente aplicada para destroçar *P. pachyrrhizi* e patogenias relacionadas.

10               Será mostrado por meio dos exemplos que se seguem como identificar peptídeos que se ligam a esporos infectivos de *P. pachyrrhizi* e cistos recentemente germinados, bem como os esporos de patogenias análogas ou relacionadas. Uma coleção de peptídeos é gerada e confirmada para se ligar a esporos infectivos, ou tubos de germe (cistos recentemente germinados) da patogenia. Para identificar os peptídeos de ligação, esporos ou cistos recentemente germinados são misturados com coleções, convenientemente conhecidas como bibliotecas, ou peptídeos aleatórios que são revelados nas partículas de bacteriófagos (vírus), por exemplo, conforme mostrado por Wilson et al., 1998. Por esta aproximação, os esporos e cistos recentemente germinados podem, por meio de ilustração, serem expostos a um bilhão de peptídeos aleatórios. Uma ampla variedade de muitas bibliotecas de peptídeo adequadas é conhecida na técnica. Em algumas bibliotecas, os peptídeos contêm somente oito aminoácidos, enquanto que, em outras bibliotecas, cada peptídeo contém 15 aminoácidos.

25               Após mistura e exposição para incubação correta, lavagem pode remover todos os peptídeos que não grudam fortemente aos esporos e cistos recentemente germinados. Os esporos e cistos recentemente germinados podem ser tratados para liberar os peptídeos aderentes, aumentar seus números, e repetir o processo de seleção. Após uma pluralidade de etapas de seleção repetitivas onde cada etapa confirma a ligação de afinidade de  
30               ligação de peptídeo da etapa anterior, recuperação é certa de numerosos peptídeos que grudam muito fortemente às proteínas e outros componentes

de esporos e superfícies de tubo de germe. Em um exemplo, 3 ou 4 etapas de seleção seqüencial são suficientes para proporcionar este resultado.

Uma vez que a afinidade de ligação de peptídeo é confirmada conforme descrito acima, é possível avaliar a eficiência de peptídeos de ligação para inibir germinação de esporos e crescimento fungal. Uma vez que o número de peptídeos de ligação tenha sido identificado, é possível selecionar aqueles que impactam a função de patogenia. Os peptídeos que param a germinação de esporos e crescimento de cisto recentemente germinado são de interesse particular. Qualquer destes comportamentos disruptivos conduzirão a infecção de patogenia cessada ou reduzida, e doença. Ensaio de alto rendimento podem ser usados para testar numerosos peptídeos para capacidade de parar ou tornar lento a germinação de esporos ou crescimento vegetativo em *Phytophthora*, *P. pachyrhizi*, ou patogenias análogas. Experiência tem mostrado que uma grande percentagem de peptídeos testes pode ter um impacto no desenvolvimento de patogenia.

Uma vez que um peptídeo de defesa tenha sido identificado, ele é distribuído para pontos de infecção dentro de uma planta, sem degradação por enzimas de planta. Um método para alcançar esta distribuição é fixar o peptídeo a uma proteína que é naturalmente produzida por uma planta, e que é produzida em tecidos colonizados pela patogenia. Em um exemplo, citoquina oxidase tem sido usada com sucesso para esta proposta. Esta proteína é produzida naturalmente pelas plantas, e é envolvida na regulação do hormônio de crescimento de planta, citokinin. Os peptídeos de defesa podem ser fixados a esta proteína, e usados para modificar função de patogenia. Em um exemplo, isto tem sido feito em *Phytophthora*.

Os peptídeos de defesa podem ser fundidos para citoquina oxidase e outras proteínas que são naturalmente secretadas pelas células no espaço intercelular onde elas podem entrar em contato com a patogenia de ferrugem de colonização. Alternativamente, as fusões podem incluir proteínas que são componentes de paredes de célula de planta. Estas proteínas são também posicionadas para interagirem com a patogenia ambos inter- e intracelularmente. As bases de dados proteômicas comercialmente disponíveis

veis proporcionam uma ampla variedade de seqüências de gene para proteínas veículo de peptídeo candidatas que podem ser usadas como uma alternativa para CKX. Estas estruturas de proteína veículo podem ser analisadas usando-se algoritmos proteômicos estruturais convencionais para apresentação ou revelação ótimas do peptídeo de defesa.

Constructos de proteína-peptídeo candidatos podem ser expressos e secretados inicialmente na levedura, *Pichia*. Este hospedeiro facilita a concentração e purificação de uma proteína ou polipeptídeo, e testa os mesmos para inibição de germinação de esporo de patogenia e crescimento de cisto recentemente germinado.

Uma vez que os melhores peptídeos de defesa e os melhores modos de revelação na proteína veículo são confirmados, constructos genéticos podem ser formados para confirmação na planta, tal como soja ou feijão de campo. Métodos de transformação e expressão de planta de genes estranhos são bem-conhecidos na técnica.

Patogênias particularmente virulentas e perigosas, similares a *P. pachyrhizi*, são contidas por regulação governamental. Este perigo e a complexidade regulatória são evitados pelo uso de protocolos de seleção de peptídeo inicial usando uma patogenia de ferrugem alternativa ou análoga. *Puccinia polysora*, a patogenia fungal que causa ferrugem do sul de milho foi reportada por Hollier e King, 1985. Esta patogenia é prontamente disponível sem restrições, e pode ser manipulada sob condições laboratoriais padrão.

Em uma concretização, bibliotecas de peptídeo são construídas pela inserção de seqüências de ácido nucléico que codificam peptídeos de seis a 15 aminoácidos de comprimento em vetores adequados, embora seqüências que codificam peptídeos mais longos possam ser usadas. Os peptídeos codificados pelos nucleotídeos podem ser completamente aleatórios em natureza, ou podem ser restringidos em sua composição para encontrar os requerimentos estruturais e funcionais. Por exemplo, e sem limitação, uma ponte de cisteína pode ser inserida no peptídeo. Em uma concretização, a seqüência de ácido nucléico não codifica uma imunoglobulina (anticorpo), ou uma região de imunoglobulina reconhecida, tal como uma região

variável. Qualquer vetor que expressará os oligonucleotídeos pode ser usado. Preferivelmente um vetor é usado, que resultará em expressão da biblioteca de peptídeo na superfície de uma célula ou vírus, ou na superfície de um compartimento intracelular ou organela de uma célula ou vírus. Dessa maneira, os peptídeos expressos estarão disponíveis para interagirem com moléculas-alvo potenciais, ou células que entram em contato com a superfície contendo os peptídeos. Conforme será aparente a um versado na técnica, se os peptídeos são expressos na superfície de compartimentos intracelulares ou organelas, o alvo potencial deve também residir intracelularmente, ou a organela ou compartimento intracelular devem ser expostos ao ambiente externo por, por exemplo, lisis da célula.

Métodos de produção de oligonucleotídeos e inserção dos mesmos em vetores são bem-conhecidos àqueles versados na técnica, e somente serão brevemente revistos aqui. Mais comumente, os oligonucleotídeos são sintetizados em um suporte sólido usando método de fosfite triéster de Beaucage e Caruthers (Tetrahedron Lett. 22:1859-1862, 1981; ver também, Patentes dos Estados Unidos Números 4.973.679 e 4.458.066). Numerosos suportes sólidos são disponíveis, incluindo gotas de vidro de poro controlado, copolímeros de poliestireno, sílica-gel e papel celulose. A preparação de um oligonucleotídeo começa com a ligação do grupo 3'-hidroxila do primeiro nucleosídeo ao suporte sólido. Suportes sólidos contendo nucleotídeos são disponíveis de fontes comerciais. O oligonucleotídeo é sintetizado a partir da direção 3' a 5', e a cadeia é alongada por ataque nucleofílico do 5'-hidroxila do oligonucleotídeo imobilizado no 3'-fosfato ativado ou fosorframidita de um bloco de construção 5'-protegido solúvel. O dinucleosídeo fosfite intermediário formado deve, em seguida, ser oxidado ao fosfato mais estável antes da extensão de cadeia. O processo é repetido até que o número desejado de nucleotídeos tenha sido adicionado. Dispositivos automáticos são comercialmente disponíveis para a síntese de oligonucleotídeos. Em adição, numerosos fornecedores proporcionam serviços de síntese de oligonucleotídeos customizados.

Qualquer sistema de vetor capaz de expressar os peptídeos da

biblioteca de peptídeo pode ser usado na prática, e numerosos sistemas de vetor são conhecidos na técnica (Ver, por exemplo, Wilson e Findlay, *Can. J. Microbiol.*, 44:313-329, 1998). Quando o peptídeo é preparado como parte de pVIII, sistemas de fago adequados incluem tipo 8, tipo 88, e tipo 8+8.

5 Quando pIII é utilizado, sistemas de fago adequados incluem tipo 3, tipo 33 e tipo 3+3. Quando o peptídeo é inserido em pVI, sistemas de fago adequados incluem tipo 6, tipo 66, e tipo 6+6. Em adição, sistema de vetor de fago T7 e fago 8 podem ser usados. Em uma concretização preferida, os peptídeos da biblioteca são expressos fundidos para uma proteína de revestimento de um

10 bacteriófago filamentoso, de modo que os peptídeos são expressos na superfície do virion e, desse modo, são disponíveis para interagirem com moléculas-alvo, ou receptores de superfície de célula. Em uma concretização preferida, a biblioteca f8-1 é usada em que peptídeos 8-mer aleatórios são fundidos para a proteína de revestimento pVIII. Em outra concretização pre-

15 ferida, a biblioteca f88-4 é usada em que peptídeos 15-mer aleatórios são fundidos para a proteína de revestimento pVIII. O fago na biblioteca f88-4 prepara peptídeos sem tendência de ocorrência de aminoácido. O fago na biblioteca f8-1 são não-inclinados, com a exceção de alanina na primeira posição, e um de quatro resíduos na segunda posição. Todas as outras po-

20 sições são aleatoriamente ocupadas por qualquer aminoácido.

Métodos para produção da biblioteca de peptídeo de produção de fago f8-1 foram descritos anteriormente (Ver, Petrenko et al., *Prot. Engineering*, 9:797-801, 1996, e referências aqui citadas). A biblioteca revela peptídeos estranhos em toda cópia das 3900 cópias de proteína de revesti-

25 mento maior pVIII. A expressão de peptídeo necessita não ser induzida por IPTG. O oligonucleotídeo degenerado usado para o inserto de 8-aminoácido é: GCA GNN (NNN)<sub>7</sub>, onde N é qualquer nucleotídeo. Portanto, o primeiro aminoácido é uma alanina (A), e o segundo aminoácido é uma valina (V), alanina (A), aspartato (D), glutamato (E), ou glicina (G). O restante dos ami-

30 noácidos no peptídeo é completamente aleatório.

Do mesmo modo, métodos para a produção de biblioteca de peptídeo de produção de fago f88-4 foram também anteriormente descritos

(Zhong et al., *J. Biol. Chem.* 269:24183-24188, 1994; Smith e Scott, *Methods in Enzymology*, 217:228-257, 1993; Smith, *Gene*, 128:1-2, 1993, e referências aqui citadas). Esta biblioteca revela peptídeos estranhos de 15 aminoácidos em 150 a 300 cópias de proteína de revestimento maior pVIII. O restante das 3900 cópias das subunidades pVIII são derivadas da pVIII tipo selvagem. O genoma de fago desse modo suporta dois genes pVIII que codificam dois tipos diferentes de moléculas pVIII. Uma pVIII é o recombinante que revela o peptídeo 15-mer estranho, enquanto a outra é a pVIII tipo selvagem normalmente presente no fago. A expressão do gene pVIII recombinante é acionada pelo promotor/operador de tac que se pode induzir por IPTG. Devido a presença de dois genes pVIII, o virion f88 consiste em um modelo de mosaico de subunidades pVIII tipo selvagem e recombinante.

A seqüência de oligonucleotídeo usada para insertos de 15-mer aminoácido é (NNK)<sub>15</sub>, onde N é A, T, C ou G, e K designa G ou T. Desse modo, a região que circunda o inserto 15-mer é: LVPMLS-FA(X)<sub>15</sub>PAEGDDPAKA (SEQ ID NO:1), onde X é aminoácido codificado pelo códon NNK.

As partículas de fago podem ser usadas para selecionar os peptídeos aleatórios expressos no virion por sua capacidade de se ligar a compostos e células de interesse. Em uma concretização preferida, a biblioteca de peptídeo de produção de fago é usada para selecionar peptídeos que se ligam a patogenicias de planta. Em outra concretização preferida, os peptídeos são selecionados por sua capacidade de se ligar a fungos patogênicos. Em ainda outra concretização preferida, peptídeos de produção de fago são selecionados por sua capacidade de se ligar a membros do gênero *Phytophthora*. Quando se examinam patogenicias com mais do que um estágio de vida simples, é preferível que cada estágio de vida seja examinado, visto que diferenças significantes no número, tipos e afinidade de locais de ligação podem ocorrer com mudanças nos estágios de desenvolvimento.

Por exemplo, quando se examinam membros do gênero *Phytophthora*, aproximadamente  $10^5$  a  $10^6$  organismos são misturados com aproximadamente  $10^8$  a  $10^9$  peptídeos de produção de fago, e incubados por um

tempo suficiente para permitir ligação. Será aparente àqueles versados na técnica que, dependendo de fatores tais como a espécie de patogenia, o fago e o peptídeo, que outras concentrações de organismos e peptídeos produzidos podem ser usadas de acordo com a presente descrição. Em alguns casos, pode ser desejável pré-incubar os peptídeos preparados com outros estágios de vida do mesmo organismo de modo a identificar aqueles peptídeos que se ligam somente a um estágio de vida específico. Após incubação, o organismo é submetido a lavagens múltiplas, de modo a remover peptídeos não-ligados e fracamente ligados. No caso de zoósporos de *Phytophthora*, a lavagem é feita usando-se uma solução de aproximadamente 50 mM de LiCl. Após lavagem, peptídeos preparados por fago ligado são eluídos, preferivelmente em pH baixo, e o fago eluído amplificado em um hospedeiro adequado. Em uma concretização, o hospedeiro é K91 *E. coli*. Métodos para amplificação de bacteriófago em *E. coli* são bem-conhecidos na técnica, e podem ser encontrados, por exemplo, em Smith e Scott, *Methods in Enzymology*, 217:228-257, 1993; Ausubel et al. eds., *Short Protocols in Molecular Biology*, 2nd ed., Wiley & Sons, 1995; e Sambrook et al., *Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989. Em uma concretização, o procedimento de seleção é repetido pelo menos uma vez de modo a enriquecer peptídeos preparados por fago de alta afinidade. Em outra concretização, o processo de seleção é repetido três vezes.

Uma vez que os peptídeos de alta afinidade preparados por fago são identificados, os fagos são amplificados, preferivelmente em *E. coli*, e o DNA isolado de fago usando métodos padrão, tais como aqueles encontrados em, por exemplo, Smith e Scott, *Methods in Enzymology*, 217:228-257, 1993; Ausubel et al. eds., *Short Protocols in Molecular Biology*, 2nd ed., Wiley & Sons, 1995; e Sambrook et al., *Molecular Cloning*, 2nd ed., *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989. Uma vez que o DNA de fago tenha sido isolado, os oligonucleotídeos inseridos podem ser clivados a partir do DNA usando-se as mesmas enzimas de restrição usadas para inserir os oligonucleotídeos, e os fragmentos de enzima de restrição separados a partir do restante do DNA. Os oligonucleotídeos podem, em seguida, serem seqüen-

ciados usando-se qualquer método padrão. O seqüenciamento pode ser efetuado por qualquer método adequado, por exemplo, dideoxi seqüenciamento (Sanger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5463-5467), seqüenciamento químico (Maxam and Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:560-564, 1977),  
5 ou qualquer variação desta, incluindo o uso de seqüenciadores automáticos. Em uma concretização, o seqüenciamento é acompanhado usando-se um seqüenciador ABI Prism 377 automático (*Applied Biosystems*, Foster City, Calif). Uma vez que o seqüenciamento do oligonucleotídeo é conhecido, as seqüências de aminoácido dos peptídeos codificados podem ser prontamente deduzidas usando-se o código genético.  
10

Os peptídeos preparados por fago de ligação de alta afinidade podem ser adicionalmente selecionados por sua capacidade de alterar o desenvolvimento, crescimento e/ou infectividade da patogenia. Nesta concretização, os peptídeos preparados por fago são incubados com uma patogene-  
15 nia-alvo por um tempo suficiente para permitir ligação. Em seguida à ligação, a patogenia é observada para alterações em seu desenvolvimento ou capacidade de infectar um hospedeiro. Em uma concretização, aproximadamente 200 zoósporos de um membro do gênero *Phytophthora* são combinados com um peptídeo preparado por fago em água destilada em diluições em  
20 série duas vezes em volume constante em pratos petri. A faixa de concentrações de fago pode variar, mas geralmente varia entre 1 a  $10 \times 10^9$  virion/ $\mu$ l. Um controle negativo não contendo fago é incluído em cada seleção. Após um período de incubação de usualmente cerca de 20 minutos à temperatura ambiente, o número de zoósporos encistados em cada concentração  
25 de fago é determinado. Usando-se este método, é possível selecionar racionalmente peptídeos de caráter definido e avaliá-los para indução de espécie e específica de estágio de vida de respostas funcionais mediadas por receptor, tal como encistamento de zoósporo. Os peptídeos encontrados para interferirem com o desenvolvimento de uma patogenia podem ser usados para  
30 impedir ou limitar infecção de um hospedeiro com a patogenia.

O presente método pode também ser usado para caracterizar receptores de ligação de peptídeo na superfície de patogenias de planta.

Nesta concretização, o peptídeo de preparação de fago que foi etiquetado (fago teste) é incubado com células de organismos diferentes, e em estágios diferentes de desenvolvimento. A afinidade de ligação relativa do fago etiquetado pode, em seguida, ser determinada pela ligação competitiva e análise de Scatchard. Em uma análise de ligação competitiva, uma concentração constante de fagos testes é permitida se ligar a uma patogenicidade-alvo e, em seguida, fago de competição não-etiquetado é adicionado sobre uma faixa de concentrações. O fago de competição pode ser o mesmo como o fago teste, ou pode ser diferente. A patogenicidade-alvo é, em seguida, lavada para remover fago especificamente ou fracamente ligado, e a quantidade de fago teste ligado é determinada pela medição da quantidade de etiqueta presente nas células-alvo. O grau de competição pode ser medido conforme a concentração de fago de competição requerido para inibir ligação do fago teste por 50% ( $IC_{50}$ ). Os resultados dos ensaios de competição podem ser usados para determinar mudanças no número, tipo e afinidade de receptores de superfície de célula sobre o tempo.

Dentro do escopo das instrumentalidades descritas, estão oligonucleotídeos recombinantes, descobertos pelo método aqui ensinado, que codificam peptídeos tendo atividade antifúngica. Estes oligonucleotídeos recombinantes podem ser usados para produzir polinucleotídeos recombinantes que são comumente usados como vetores de clonagem e de expressão, embora outros usos sejam possíveis. Um vetor de clonagem é uma molécula de DNA auto-replicante que serve para transferir um segmento de DNA em uma célula hospedeira. Os três tipos mais comuns de vetores de clonagem são plasmídeos bacteriais, fagos, e outras viroses. Um vetor de expressão é um vetor de clonagem designado de modo que uma seqüência de codificação inserida em um local particular será transcrita e transladada em uma proteína.

Ambos os vetores de clonagem e de expressão contêm seqüências de nucleotídeo que permitem que os vetores repliquem uma ou mais células hospedeiras adequadas. Nos vetores de clonagem, esta seqüência é geralmente uma que capacita o vetor a replicar independentemente dos

cromossomos da célula hospedeira, e também inclui quaisquer origens de replicação ou seqüências de replicação autônomas. Várias origens bacteriais e virais de replicação são bem-conhecidas àqueles versados na técnica, e incluem, mas não estão limitadas a, origem de plasmídeo pBR322, origem de plasmídeo de 2  $\mu$ s, e origens de SV40, de polioma, de adenovírus, de VSV e origens virais BPV.

As seqüências de oligonucleotídeos da presente descrição podem ser usadas para produzir peptídeos antifúngais pelo uso de vetores de expressão recombinantes contendo a seqüência de oligonucleotídeo. Os vetores de expressão adequados incluem seqüências de DNA cromossomal, não-cromossomal e sintético, por exemplo, derivados de SV 40; plasmídeos bacteriais; DNA de fago; baculovírus; plasmídeo de levedura; vetores derivados de combinações de plasmídeos e DNA de fago; e DNA viral, tal como vacina, adenovírus, vírus fowl pox, e pseudorabies. Em adição, qualquer outro vetor que é replicável e viável no hospedeiro pode ser usado.

A seqüência de nucleotídeo de interesse pode ser inserida no vetor por uma variedade de métodos. Nos métodos mais comum, a seqüência é inserida em local(is) de endonuclease de restrição apropriado(s) usando-se procedimentos comumente conhecidos àqueles versados na técnica, e detalhados, por exemplo, em Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Press, (1981) e Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology*, 2nd ed., John Wiley & Sons (1992).

Em um vetor de expressão, a seqüência de interesse é operavelmente ligada a uma seqüência de controle de expressão adequada, ou promotor reconhecido pela célula hospedeira para direcionar síntese de mRNA. Os promotores são seqüências não-transladadas localizadas geralmente 100 a 1000 pares bases (bp) a montante a partir do códon de partida de um gene estrutural que regula a transcrição e translação de seqüências de ácido nucléico sob seu controle. Os promotores são geralmente classificados como, ou induzíveis, ou constitutivos. Promotores induzíveis são promotores que iniciam níveis aumentados de transcrição de DNA sob seu controle na resposta de alguma mudança no ambiente, por exemplo, a presença

ou ausência de um nutriente, ou uma mudança na temperatura. Promotores constitutivos, em contraste, mantêm um nível relativamente constante de transcrição.

Uma seqüência de ácido nucléico é operavelmente ligada quando é colocada em um relacionamento funcional com outra seqüência de ácido nucléico. Por exemplo, DNA para uma pré- seqüência ou condutor secretório é operativamente ligado a DNA para um polipeptídeo se ele é expresso como uma proteína que participa na secreção do polipeptídeo; um promotor é operavelmente ligado a uma seqüência de codificação se ele afeta a transcrição da seqüência ; ou um local de ligação de ribossoma é operavelmente ligado a uma seqüência de codificação se ele está posicionado de modo a facilitar translação. Geralmente, seqüências operavelmente ligadas são contíguas e, no caso de um condutor secretório, contíguas e em fase de leitura. A ligação é alcançada pela ligação em locais de enzima de restrição. Se locais de restrição adequados não são disponíveis, então adaptadores de oligonucleotídeo sintéticos ou ligantes podem ser usados, conforme é conhecido àquele versado na técnica, Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Press, (1989) e Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology*, 2nd ed., John Wiley & Sons (1992).

Promotores comuns usados em vetores de expressão incluem, mas não estão limitados a, promotor LTR ou SV40, os promotores de *E. coli* lac ou tpr, e o promotor de fago lâmbida PL. Promotores de planta induzíveis úteis incluem promotores de choque térmico (Ou-Lee et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:6815; Ainley et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 14: 949), um promotor induzível de nitrato derivado de gene espinafre nitrito reductase (Back et al. (1991) *Plant Mol. Biol.* 17:9), promotores induzíveis de hormônio (Yamaguchi-Shinozaki et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:905; Kares et al., (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:905), e promotores induzíveis leves associados com a subunidade pequena de RuBP carboxilase e famílias de gene LHCP (Kuhlemeier et al. (1989) *Plant Cell* 1:471; Feinbaum et al. (1991) *Mol Gen. Genet.* 226:449; Weisshaar et al. (1991) *EMBO J.* 10: 1777; Lam and Chua (1990) *Science* 248:471; Castresana et al. (1988) *EMBO J.* 7:1929; Schulze-

Lefert et al. (1989) *EMBO J.* 8: 651). Outros promotores conhecidos para controlar a expressão de genes em células procarióticas ou eucarióticas podem ser usados, e são conhecidos àquele versado na técnica. Vetores de expressão podem conter um local de ligação de ribossomo para iniciação de translação, e um terminador de transcrição. O vetor pode também conter seqüências úteis para amplificação de expressão de gene.

Vetores de expressão e clonagem podem, e usualmente contêm, um gene de seleção, ou marcador de seleção. Tipicamente, este gene codifica uma proteína necessária para a sobrevivência ou crescimento da célula hospedeira transformada com o vetor. Exemplos de marcadores adequados incluem dihidrofolato reductase (DHFR), ou resistência à neomycin para células eucarióticas, e resistência à tetraciclina ou ampicilina para *E. coli*. Marcadores de seleção em plantas incluem resistência à blenomycin, glifosato, higromycin, kanamycin, metotrexato, fleomycin, fosfinotricin, spectinomycin, streptomycin, sulfonamida e sulfoniluréias. Maliga et al., *Methods in Plant Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Press, 1995, p. 39.

Em adição, vetores de expressão podem também conter seqüências marcadoras ligadas a uma seqüência de nucleotídeo para uma proteína que codifica uma proteína adicional usada como um marcador. O resultado é um híbrido ou proteína de fusão compreendendo duas proteínas ligadas e diferentes. A proteína marcadora pode proporcionar, por exemplo, um marcador imunológico ou enzimático para a proteína recombinante produzida pelo vetor de expressão. Marcadores adequados incluem, mas não estão limitados a, fosfatase alcalina (AP), myc, hemagglutinin (HA),  $\beta$ -glucuronidase (GUS), luciferase, e proteína fluorescente verde (GFP).

As seqüências de polinucleotídeo da presente descrição podem também ser parte de um cassete de expressão que em um mínimo compreende, operavelmente ligada na direção 5' a 3', uma seqüência regulatória, tal como um promotor, um polinucleotídeo que codifica um peptídeo da presente descrição, e uma seqüência de sinal de terminação transcricional funcional em uma célula hospedeira. O promotor pode ser de qualquer dos tipos aqui discutidos, por exemplo, um promotor específico de tecido, um promotor

desenvolvimentalmente regulado, um promotor específico de organela, um promotor específico de semente, um promotor específico de plastídeo, etc. O cassete de expressão pode adicionalmente compreender uma região de codificação de peptídeo operavelmente ligada de alvejamento, de trânsito ou de secreção, capaz de direcionar transporte da proteína produzida. O cassette de expressão pode adicionalmente compreender uma seqüência de nucleotídeo que codifica um marcador selecionável, e/ou uma porção de purificação.

Mais particularmente, a presente descrição inclui construtos recombinantes compreendendo uma seqüência de polinucleotídeo isolado que codifica os peptídeos antifúngais da presente descrição. Os construtos podem incluir um vetor, tal como um plasmídeo, ou vetor viral, em que a seqüência foi inserida, ou na orientação de avanço, ou reversa. O construto recombinante pode adicionalmente compreender seqüências regulatórias, incluindo, por exemplo, um promotor operativamente ligado à seqüência. Grandes números de vetores adequados e promotores são conhecidos àquele versado na técnica, e são comercialmente disponíveis.

Uma concretização adicional da presente descrição se refere a células hospedeiras transformadas contendo construtos compreendendo as seqüências de oligonucleotídeo da presente descrição. A célula hospedeira pode ser uma célula eucariótica mais alta, tal como uma célula de mamífero ou de planta, ou uma célula eucariótica inferior, tal como uma célula de levedura, ou o hospedeiro pode ser uma célula procariótica, tal como uma célula bacteriana. A introdução do construto na célula hospedeira pode ser acompanhada por uma variedade de métodos, incluindo transfecção de fosfato de cálcio, transfecção mediada por DEAE-dextran, Polibreno, fusão de protoplasto, lipossomas, microinjeção direta no núcleo, carregamento de raspagem, e eletroporação. Em plantas, uma variedade de métodos diferentes pode ser empregada para introduzir vetores de transformação/expressão em protoplastos de planta, células, tecidos de calo, discos de folha, meristemas, etc., para gerar plantas transgênicas. Estes métodos incluem, por exemplo, transformação mediada por *Agrobacterium*, distribuição de canhão de partí-

cula, microinjeção, eletroporação, transformação de protoplasto mediada por polietileno glicol, transformação mediada por lipossoma, etc (revisado em Potrykus (1991) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:205).

Os peptídeos produzidos por expressão dos polinucleotídeos da presente descrição podem ser obtidos pela transformação de uma célula hospedeira por qualquer dos métodos anteriormente descritos, desenvolvendo a célula hospedeira sob condições apropriadas, induzindo expressão do polinucleotídeo, e isolamento da(s) proteína(s) de interesse. Se a proteína é retida no interior da célula hospedeira, a proteína pode ser obtida por lisis das células hospedeiras, enquanto se a proteína é uma proteína secreta-  
10 tada, ela pode ser isolada a partir do meio de cultura. Vários métodos são disponíveis para purificação de proteínas, e são conhecidos àquele versado na técnica. Estes incluem precipitação por, por exemplo, sulfato de amônia ou precipitação de etanol, extração de ácido, cromatografia de troca de ânion ou cátion, cromatografia de fosfocelulose, cromatografia de interação  
15 hidrofóbica, cromatografia de afinidade, cromatografia de hidroxilapatita, cromatografia de lectin, cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), eletroforese sob condições nativa ou de desnaturação, focalização isoeletrica, e imunoprecipitação.

20 Alternativamente, peptídeos codificados pelos polinucleotídeos da presente descrição podem ser produzidos por síntese química usando-se, ou síntese de peptídeo de fase sólida, ou por síntese de peptídeo de solução clássica também conhecida como síntese de peptídeo de fase líquida. Na síntese de fase líquida suportada por oligômero, o desenvolvimento do produto é fixado a um grupo polimérico solúvel grande. O produto de cada etapa da síntese pode, em seguida, ser separado de reagentes não-reagidos baseados na grande diferença de tamanho entre o produto fixado de polímero relativamente grande e os reagentes não-reagidos. Isto permite que reações ocorram em soluções homogêneas, e eliminem etapas de purificação  
25 tediosas associadas com síntese de fase líquida tradicional. A síntese de fase líquida suportada por oligômero também foi adaptada a síntese de fase líquida automática de peptídeos.  
30

Para síntese de peptídeo de fase sólida, o procedimento requer o conjunto seqüencial dos aminoácidos apropriados em um peptídeo de uma seqüência desejada, enquanto o final do desenvolvimento de peptídeo está ligado a um suporte insolúvel. Usualmente, o terminal carboxila do peptídeo é ligado a um polímero do qual pode ser liberado sob tratamento com um reagente de clivagem. Em um método comum, um aminoácido é ligado a uma partícula de resina, e o peptídeo gerado em uma maneira gradual por adições sucessivas de aminoácidos protegidos para produzir uma cadeia de aminoácidos. As modificações da técnica descrita por Merrifield são comumente usadas (ver, por exemplo, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 96:2989-93, 1964). Em um método de fase sólida automático, peptídeos são sintetizados pelo carregamento de aminoácido de terminal carbóxi em um ligante orgânico (por exemplo, PAM, 4-oximetilfenilacetamidometil), que é covalentemente fixado a uma resina de poliestireno insolúvel reticulada com divinil benzeno. A amina terminal pode ser protegida pelo bloqueio com t-butiloxicarbonila. Grupos hidroxila e carboxila são comumente protegidos pelo bloqueio com grupos O-benzila. A síntese é acompanhada em um sintetizador de peptídeo automático, um número do qual são comercialmente disponíveis. Em seguida à síntese, o produto pode ser removido da resina. Os grupos de bloqueio são removidos tipicamente pelo uso de ácido hidrófluórico ou ácido trifluorometil sulfônico, de acordo com os métodos estabelecidos (por exemplo, Bergot e McCurdy, *Applied Biosystems Bulletin*, 1987). Em seguida à clivagem e purificação, um rendimento de aproximadamente 60 a 70% é tipicamente produzido. A purificação do peptídeo produto é acompanhada por, por exemplo, cristalização do peptídeo de um solvente orgânico, tal como metilbutil éter, em seguida dissolução em água destilada, e usando-se diálise (se o peso molecular do peptídeo objeto é maior do que cerca de 500 dáltons), ou cromatografia líquida de alta pressão reversa (por exemplo, usando-se uma coluna C18 com 0,1% de ácido trifluoracético e acetonitrila como solventes) se o peso molecular do peptídeo é menor do que 500 dáltons. O peptídeo purificado pode ser liofilizado e armazenado em um estado seco até uso. A análise dos peptídeos resultantes pode ser acompanhada usan-

do-se os métodos comuns de cromatografia líquida de alta pressão analítica (HPLC), e espectrometria de massa de eletropulverização (ES-MS).

Em geral, plantas transgênicas compreendendo células contendo polinucleotídeos da presente descrição podem ser produzidas por qualquer dos métodos precedentes; seleção de células de planta que foram transformadas em um meio seletivo; regeneração de células de planta que foram transformadas para produzir plantas diferenciais; e seleção de uma planta transformada que expressa a(s) proteína(s) codificada(s) pelos polinucleotídeos da presente descrição em um nível desejado. Métodos específicos para transformação de uma ampla variedade de dicots e obtenção de plantas transgênicas são bem-documentados na literatura (Gasser e Fraley, *Science* 244:1293, 1989; Fisk e Dandekar, *Scientia Horticulturae* 55:5, 1993; e as referências citadas neste).

Transformação bem-sucedida e regeneração de planta têm sido alcançadas em uma variedade de monocots. Exemplos específicos são como segue: aspargus (*asparagus officinalis*; Bytebier et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5345); cevada (*Hordeum vulgare*; Wan e Lemaux (1994) *Plant Physiol.* 104:37); milho (*Zea mays*; Rhodes et al. (1985) *Science* 240:204; Gordon-Kamm et al. (1990) *Plant Cell* 2: 603; Fromm et al. (1990) *Bio/Technology* 8: 833; Koziel et al. (1993) *Bio/Technology* 11: 194); aveias (*Avena sativa*; Somers et al. (1992) *Bio/Technology* 10:1589); grama de pomar (*Dactylis glomerata*; Horn et al. (1988) *Plant Cell Rep.* 7: 469); arroz (*Oryza sativa*, incluindo variedades indica e japonica; Toriyama et al. (1988) *Bio/Technology* 6: 10; Zhang et al. (1988) *Plant Cell Rep.* 7: 379; Luo e Wu (1988) *Plant Mol. Biol. Rep.* 6: 165; Zhang e Wu (1988) *Theor. Appl. Genet.* 76: 835; Christou et al. (1991) *Bio/Technology* 9: 957); centeio (*Secale cereale*; De la Pena et al. (1987) *Nature* 325: 274); sorgo (*Sorghum bicolor*; Cassas et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11212); cana de açúcar (*Saccharum spp*; Bower e Birch (1992) *Plant J.* 2: 409); vivazes altas (*Festuca arundinacea*; Wang et al. (1992) *Bio/Technology* 10: 691); gramado (*Agrostis palustris*; Zhong et al (1993) *Plant Cell Rep.* 13; 1); e trigo (*Triticum aestivum*; Vasil et al., (1992) *Bio/Technology* 10: 667; Weeks et al. (1993)

*Plant Physiol.* 102: 1077; Becker et al. (1994) *Plant J.* 5: 299).

Em uma concretização preferida, as plantas são transformadas com polinucleotídeos recombinantes que codificam os peptídeos antifungais da presente descrição, que resultam nos peptídeos sendo secretados pela planta. Em outra concretização preferida, os peptídeos antifungais são se-  
 5 cretados pelas raízes da planta transformada. As plantas que secretam peptídeos antifungais podem ser construídas pelos métodos acima descritos usando-se cassetes de expressão que incorporam uma seqüência de secre-  
 ção que direcionam secreção dos peptídeos. Alternativamente, as plantas  
 10 podem ser transformadas com uma seqüência de nucleotídeo que codifica uma proteína de fusão construída a partir dos peptídeos antifungais da presente descrição, e uma proteína que é normalmente secretada pela planta. Por exemplo, uma proteína de fusão pode ser produzida entre um peptídeo antifungal e a enzima citocininas oxidase. A citocinin oxidase é uma enzima  
 15 protetora que age para degradar citokinins exógenas que podem interferir com o controle de crescimento de planta. Pela fusão dos peptídeos antifungais para a região do gene citocinin oxidase que controla a secreção, o peptídeo antifungal seria secretado pela planta transformada, proporcionando, desse modo, proteção de fungos patogênicos.

20 Antes de serem usadas para transformar plantas, as proteínas de fusão contendo peptídeos antifungais podem ser selecionadas por atividade usando-se o método de preparação de fago da presente descrição. Em geral, uma proteína de fusão pode ser construída contendo um peptídeo antifungal; a porção de controle secretório de uma proteína, tal como citocinin oxidase; e a proteína de revestimento de fago pVIII ou pIII. As proteínas de  
 25 fusão preparadas por fago assim construídas podem, em seguida, serem selecionadas usando-se o método da presente descrição para selecionar aquelas proteínas de fusão que se ligam a um fungo patogênico-alvo, e resultam em alterações que limitam a patogenicidade.

### 30 Exemplos

Os seguintes exemplos são pretendidos para proporcionar ilustrações da aplicação da presente descrição. Os exemplos seguintes não são

pretendidos para definir completamente, ou, de outro modo, limitar o escopo da invenção.

#### Exemplo 1

##### Espécie Fungal e Produção de Zoósporo

5                   As cepas fungais usadas foram *P. capsici* (ATCCC 15399); *P. soj*  
*sojae* (cepa 7-6-1, curso 25) (A. F. Schmitthenner, Ohio State University); e  
*Phytophthora parasítica*. Todas as culturas foram mantidas como micélio em  
placas de ágar de feijão-de-lima (*P. sojae*), ou placas de ágar de farinha de  
10 milho (Difco, USA) (*P. capsici* e *P. parasítica*) a 15 graus C. Cópias de micé-  
lio foram produzidas por transferência de porções de micélio (5 mm x 5 mm)  
para placas de ágar contendo 10% de suco de verdura V8® (Campbell Soup  
Co., USA). Três porções por placa foram desenvolvidas por três a seis dias a  
25 graus C. Produção de esporângio foi induzida em *P. capsici* por limpeza  
15 das placas e incubação a 25 graus C com luz. Após um a dois dias, a libera-  
ção de zoósporo foi induzida por inundação das placas com água estéril por  
20 a 30 minutos. A produção de zoósporo de *P. parastica* foi idêntica àquela  
de *P. capsici*, exceto que as placas foram lavadas com água estéril por dois  
minutos antes da incubação a 25 graus C com luz. A liberação de zoósporo  
20 foi induzida de esporângio de *P. sojae* por inundamento das placas por qua-  
tro vezes em água estéril em intervalos de 30 minutos. Os zoósporos foram  
liberados dentro de duas a quatro horas. Após sua liberação, os zoósporos  
foram filtrados através de quatro camadas de tecido grosseiro de algodão  
para remover casos esporangiais e fragmentos de micélio. Uma amostra da  
suspensão foi girada por 30 segundos para induzir encistamento, e o cisto  
25 contado sob um microscópio em um hemacitômetro.

#### Exemplo 2

Preparação de Células de K19kan *E. coli* Não-Alimentadas e  
Fago Titerinz como Unidades de Transdução

30                   Antes da seleção da biblioteca, os fagos foram titulados como  
unidades de transdução de tetraciclina (TU) em células não-alimentadas de  
K91BluKan (resistente à kanomycin) *Escherichia coli*, de acordo com méto-  
dos publicados (Smith & Scott, *Methods in Enzymology*, 217:228-257, 1993;

Yu and Smith, *Methods em Enzymology*, 267:3-27, 1996). As unidades de transdução são um modo eficaz de medir a infectividade do fago, e são usualmente expressas como TU/ml de fago. Brevemente, células K91BluKan foram desenvolvidas a 37 graus C com agitação vigorosa (~ 170 rpm) em 20 ml de supercaldo (Smith and Scott, *Methods in Enzymology*, 217:228-257, 1993) para fase de log média ( $OD_{600} \sim 0,45$ ). As células foram, em seguida, incubadas com agitação branda por um adicional de 5 minutos para permitir qualquer fplII cortado regenerar. As células foram centrifugadas em um tubo de 50 ml estéril de Oak Ridge a 2200 rpm por 10 minutos em um rotor Sorvall SS34 a 4 graus C. O sobrenadante foi derramado, e as células foram ressuspensas em 20 ml de 80 mM de NaCl, colocadas em um frasco de 125 ml de cultura, e sacudidas brandamente por 45 minutos a 37 graus C e 70 rpm. As células foram, em seguida, centrifugadas conforme acima, e ressuspensas em 1 ml de tampão NAP frio. As células não-alimentadas foram armazenadas a 4 graus C, e permaneceram infectivas por 3 a 5 dias.

Os fagos foram titulados como unidades de transdução (TU) em células de *E. coli* K91BluKan não alimentadas (preparadas conforme acima). Os fagos foram analiticamente titulados usando-se TBS/gelatina como o diluente. Dez microlitros de cada diluição de fago foram depositados como uma gotícula na parede interna de um tubo disponível de 15 ml estéril mantido em um ângulo de 10 graus a partir da horizontal. Dez microlitros de células de *E. coli* K91BluKan não alimentadas foram adicionadas a cada gotícula de fago, e esta foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente para permitir tempo para o fago infectar as células concentradas. Após 10 minutos, 1 ml de supercaldo contendo 0,2 mg/ml de tetraciclina foi adicionado às células, e incubadas por 20 a 40 minutos a 37 graus C com agitação. Para amplificação do fago f88-4/15 mer, o supercaldo também contém 1 mM de IPTG para induzir expressão de pVIII recombinante. As células infectadas foram, em seguida, difundidas (200 ml por placa) em placas Luria-Bertani (LB) contendo 40 mg/ml de tetraciclina. As placas foram, em seguida, incubadas por ~24 horas a 37 graus C.

### Exemplo 3

### Seleção de Fago de Ligação de Zoósporo

Uma alíquota de  $10^{11}$  unidades de transdução (TU) a partir da biblioteca f8-1 (Petriko et al., 9:797-801, 1996) foi adicionada a  $10^6$  de zoósporos de *P. capsici* recentemente liberados à temperatura ambiente em 4 ml de 50 mM de LiC, e incubados por 30 minutos à temperatura ambiente com agitação branda. O mesmo procedimento foi usado para biblioteca f88-4, exceto em alguns casos zoósporos de *P. sojae* foram usados (clones Soj). Os zoósporos contendo o fago ligado foram lavados 10 vezes em 150  $\mu$ l de 50 mM de LiC, e centrifugados a 1000 x g por 45 segundos para remover fago não-ligado. Após a décima lavagem, os fagos ligados foram eluídos com 200  $\mu$ l de tampão de eluição (HCl 0,1 N), glicina suficiente para trazer pH para 2,2, 1 mg/ml de albumina de soro bovino). Os fagos eluídos foram amplificados por infecção de células de *E. coli* K91BluKan não alimentadas, conforme descrito acima. Os fagos amplificados foram, em seguida, purificados por precipitação com polietileno glicol, conforme descrito abaixo, e res-suspensos em tampão de TBS, conforme descrito por Smith and Scott (*Methods in Enzymology*, 217:228-257, 1993). Uma alíquota de fago purificado foi subseqüentemente reaplicada em zoósporos recentemente liberados, conforme descrito acima, para um total de três purificações de afinidade e duas etapas de amplificação. Enriquecimento seletivo do fago de ligação de zoósporo foi monitorado pelo cálculo de percentagem de rendimento após cada etapa de seleção, conforme descrito em Smith e Scott (*Methods in Enzymology*, 217:228-257, 1993). Isto foi feito pelo cálculo do fago total (expresso como unidades de transdução) que foi aplicado ao zoósporos, e medindo-se a produção total de fago (como unidades de transdução) que foi recuperado a partir dos zoósporos, e expressando o resultado como uma percentagem. O rendimento de fago eluído a partir dos zoósporos após cada etapa de seleção, foi entre  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$ % indicando que este procedimento foi bem-sucedido na seleção para ligação de fago para os zoósporos. Os zoósporos estavam intactos e esféricos após as etapas de lavagem, mostrando que pouco ou nenhum encistamento tinha ocorrido durante o processo de seleção.

#### Exemplo 4

##### Purificação de Fago

Células de *E. coli* K91BluKan infectadas com fago foram desenvolvidas durante a noite em 20 ml de supercaldo (contendo 40 mg/ml de tetraciclina) a 37 graus C, e 170 rpm. A cultura foi centrifugada para peletizar as células de *E. coli* (contendo fago) em um rotor SS34 por 10 minutos a 5.000 x g. O sobrenadante foi removido e colocado em um tubo novo Oak Ridge, e PEG/NaCl (16,7% de polietileno glicol/3,3 M de NaCl) foi adicionado a uma taxa de 150 l por ml de sobrenadante para precipitar o fago. Os fagos foram precipitados durante a noite a 4 graus C e, em seguida, peletizados por centrifugação em um tubo de 50 ml Oak Ridge a 10.000 rpm por 20 minutos em um rotor SS34. Os fagos peletizados foram ressuspensos em 1 ml de solução salina Tris-tamponada (TBS). Estes foram novamente reprecipitados pela adição de 150 ml de PEG/NaCl, e deixados durante a noite a 4 graus C. Os fagos foram peletizados por centrifugação em uma centrífuga superior de bancada, e o pélete foi ressuspensão em TBS.

#### Exemplo 5

##### Isolamento, Seqüenciamento e Análise de DNA

O DNA usado para seqüenciamento foi isolado de clones de fago individuais de acordo com o método de Smith e Scott (*Methods in Enzymology*, 217:228-257, 1993). DNA de filamento simples foi seqüenciado a partir de terminal 3' usando-se um seqüenciador ABI Prism 377 automático (*Applied Biosystems*, Foster City, Calif.), seguindo o protocolo do fabricante. O iniciador usado para clones f8 foi 5'-GGAGCCCTTTAATTGTATCGG-3' (SEQ ID NO:2). O iniciador usado para clones f88 foi 5'-AGT AGC AGA AGC CTG AAG A-3' (SEQ ID NO:3).

Seqüências de DNA foram traduzidas usando-se o programa de "tradução" do ExPASy Molecular Biology Server (website <http://www.expasv.ch/>). As seqüências foram comparadas com ácido nucléico e seqüências de proteína armazenadas em bases de dados de seqüência (GenBank, EMBL, dbEST, SwissProt, PIR) usando-se algoritmos padrão (isto é) FASTA (Limpman e Person, *Science*, 227:1435-1441, 1985), e coman-

dos BLAST (Altschul et. al., *J. Molecular Biol.*, 215:403-410, 1990). As seqüências de peptídeo foram alinhadas usando-se ClustalW (Thompson et al., *Nuc. Acid. Res.*, 22:4673-4680, 1994) com uma tabela de peso PAM250 e o dendograma visto usando-se Tree View (Page, *Computer Applic. Biosci.*, 12:357-358, 1996). As seqüências de f8-mer DNA obtidas codificadas para 19 seqüências de peptídeo prognosticadas (Tabela 1). A maioria dos peptídeos contém resíduos de aminoácido que foram prognosticados para serem formadores  $\alpha$ -helicoidais fortes (isto é, Glu, Ala e Leu) e quebradores  $\alpha$ -helicoidal (isto é, Gly e Pro). Apesar da falta de um motivo comum, o programa de alinhamento de seqüência múltipla ClustaW foi usado para agrupar peptídeos similares na forma de um dendograma. O dendograma, construído a partir dos peptídeos alinhados, indicou que as seqüências de peptídeo 18-mer podem ser agrupadas em seis grupos de família amplos conforme representado na figura 1 e Tabela 1. As seqüências selecionadas a partir da biblioteca f88-4/15 mer são mostradas na Tabela 2.

### Exemplo 6

#### Ensaio de Encistamento

Clones de fago selecionados foram isolados de acordo com Smith e Scott (*Methods in Enzymology*, 217:228-257, 1993), e duas vezes purificados usando-se polietileno glicol, conforme descrito acima, com a exceção que os fagos foram ressuspensos em água destilada ao invés de TBS. A concentração de virion foi calculada pela medição da absorvância a  $A_{269}$  (Smith and Scott, *Methods in Enzymology*, 217:228-257, 1993). Gotículas de água de aproximadamente 20  $\mu$ l contendo cerca de 400 zoósporos recentemente liberados foram incubadas com fago em diluições em série duas vezes, de modo que elas continham peptídeos de suporte de fago em concentrações de ou  $1 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $2,5 \times 10^9$  ou  $1,25 \times 10^9$  virion/ $\mu$ l de gotícula. Um controle negativo não recebeu fago, e foi usado para monitorar a quantidade de encistamento espontâneo na população de zoósporo. Após uma incubação de 20 minutos à temperatura ambiente, o número de zoósporos encistados foi contado, usando-se um microscópio em ampliação de 100x. A concentração de virion de fago foi calculada de acordo com Smith e Scott

(*Methods in Enzymology*, 217:228-257, 1993).

A eficiência dos peptídeos f8 na indução de encistamento prematuro variou com a família de seqüência, e com a concentração de fago (figura 2). Em uma concentração de  $1 \times 10^{10}$  virion/ $\mu$ l (64  $\mu$ M), muitas famílias de peptídeo foram eficazes na indução de encistamento. Em uma concentração de  $2,5 \times 10^9$  virion, contudo, existe uma diferença de 3 a 5 vezes nos peptídeos que causou altos níveis de encistamento (Pc42, Pc78, Pc87 e Pc64) e peptídeos causando níveis baixos de encistamento (Pc15B, Pc56 e Pc45). Em uma concentração de  $1,25 \times 10^9$  (8  $\mu$ M), todas as famílias de peptídeo eram minimamente eficazes na indução de encistamento. O fago tipo selvagem também causou encistamento dos zoósporos de *P. capsici*; contudo, a fração de zoósporos encistados pelo fago selecionado era duas a sete vezes maior do que a fração encistada pelo fago tipo selvagem em todos os experimentos. A capacidade de peptídeos que suportam fago de *P. capsici* selecionado de encistar prematuramente zoósporos foi específica para *P. capsici*. Pouco ou nenhum encistamento foi observado quando zoósporos *P. sojiae* e *P. parastica* foram incubados com peptídeos de suporte de fago a  $1 \times 10^{10}$  virion/ $\mu$ l, uma concentração que resultou em quase 100% de encistamento para zoósporos de *P. capsici*. Resultados similares foram obtidos com peptídeos f88-4 15 mer. A capacidade de peptídeos 15 mer representativos em causar encistamento prematuro em comparação ao clone f-8 Pc87 é mostrada na figura 3.

#### Exemplo 7

##### Especificidade de Ligação

Peptídeos preparados por fago com altas e baixas capacidades de indução de encistamento para sua capacidade de se ligar aos zoóporos de *P. capsici*. Os clones de fago Pc87 e Pc45 foram aleatoriamente selecionados conforme os clones representativos que induzem níveis altos e baixos de encistamento, respectivamente (cf. figura 2). O vetor de fago foi incluído como um tratamento de controle. Os clones de fago foram amplificados por infecções de *E. coli* e purificados conforme descrito acima. Para cada reação de ligação,  $5 \times 10^{10}$  TU de fago foram incubados com 200.000 zoósporos de

*P. capsici*. As reações de ligação e lavagens foram realizadas conforme descrito no Exemplo 3 para seleção de fago. Os fagos eluídos a partir da população de zoósporo foram titulados em células de *E. coli* K91BluKan, e expressos como unidades de transdução totais. Um procedimento similar foi usado para determinar se o fago selecionado se ligou aos cistos de *P. capsici*.

O vetor de fago e clones Pc45 e Pc87 se ligam diferencialmente aos zoósporos de *P. capsici*. Mais do que  $10^7$  TU de fago Pc87 foram eluídos de zoósporos após 30 minutos de incubação, enquanto somente 50.000 TU de fago Pc45 ou vetor de fago foram eluídos sob as mesmas condições (figura 4). Além disso, a ligação foi específica para o estágio de zoósporo: menos do que  $10^4$  Pc87 foram eluídos de cistos a cerca da mesma ligação observada com fago de vetor de controle (figura 5).

#### Exemplo 8

##### Construção de Proteína de Fusão Secretada

Fusões de DNA carboxi terminal foram construídos para codificar para os peptídeos de interesse pela ligação de oligonucleotídeos sintéticos nos locais de enzimas de restrição, HindIII e XbaI, do vetor transportador pJE-6. O vetor de plasmídeo pJE-6 foi construído a partir da construto de expressão de *Pichia pastoris* pROM-46 derivada a partir do plasmídeo pPICZ-alfa (Invitrogen, Carlsbad, Calif.), previamente descrito (Cregg et al., *Bio/Technology*, 11:905-910, 1993; Rosenfeld, *Methods in Enzymology*, 306:154-169, 1999). Plasmídeo pROM-46 foi digerido com endonuclease de restrição, HindIII, preenchido com enzima Klenow e dNTP's, e religado com T4 DNA ligase. Estas etapas eliminam um local de restrição de HindIII presente dentro da seqüência de alfa plasmídeo pPICZ, e o plasmídeo foi designado pJE-4. A seqüência na extremidade 3' da seqüência de codificação foi mutagenizada por PCR para substituir o códon de parada com o local de restrição HindIII. Este plasmídeo foi designado pJE-6. Os oligonucleotídeos sintéticos que codificam para um peptídeo exemplar (Pc87, ADRPSMSPT, SEQ ID NO:8) foram ligados no plasmídeo pJE-6, digeridos com HindIII e XbaI. Este plasmídeo foi designado pJE-7 (figura 6). O plasmídeo pJE-7 foi seqüenciado para confirmar o inserto, e os resultados são mostrados na figura 7.

Tabela 1

FAMÍLIA	CLONE	SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDO	SEQ ID Nº
I	Pc56	AAPDLQDAM	4
2A	Pc19	ADRLNSDAG	5
	Pc36	ADRPSTTSL	6
	Pc78	ADPPRTVST	7
	Pc87	ADRPMSPT	8
	Pc11	ADRTSNAST	9
	Pc76	ADKSYIPSS	10
2B	Pc65	AVRNPSHHS	11
	Pc44	ADPTPRGHS	12
	Pc58	ADPTRQPHS	13
	Pc45	AEHQNSAGP	14
3A	Pc14	ADARSAGAIS	15
	Pc39	ADSKNAGPM	16
	Pc53	AETKFSGSA	17
	Pc15A	ADPKGSGVT	18
3B	Pc15B	AGLTSPNDM	19
	Pc43/PC64	ADITDPMGA	20
4	PC29B	AVGHTHPDS	21
	Pc12/Pc42	AVSPNVHDG	22

Tabela 2

CLONE	SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDO	SEQ ID Nº
Cap1/18	VAAFSLVWATHLMLS	23
Cap1/12	LTRCLVSTEMAARRP	24
Cap1/9	SAPYLPYFDLLHFPI	25
Cap1/13	PSSYEASRRPEHWXF	26
Cap1/11	SATDTTLPMMTAIRS	27
Cap1/22	TRLSPMESXAMLLAP	28
Cap1/20	LLPVSPPFAPNASST	29
Cap1/24	MSNFPTSHAPCPVEI	30
Cap1/6	EFRKNYPSAAPLIPR	31
Cap1/23	PXVHGSIPLTPPLGF	32
Cap1/30	LFXCYPPCTYSYCLS	33
Cap1/1	MSNFPTSHAPCPVXI	34
Cap1/16	PEWKSSWSPCTPRCP	35
Cap1/28	AMSRWLRPRE(M/D)NAPP	36
Cap1/19	THITFXVTVXLHEPP	37
Cap1/27	MTSPRNSQLIVPFCL	38
Cap1/7	PTLGRFNRPSCSIIV	39
Soj2-2	APQCHPLPFDMIHV	40
Soj2-3	NHNSLPAQYLVLXR	41
Soj2-4; Soj2-6	DQPCTPSPDVSFYRS	42
Soj2-8	VAAPSHWLKPSLDCF	43
Soj2-9	NPLYKNPPPRVAMCL	44
Soj2-19	LIFRYAPPPLFLRPP	45

Conforme mostrado acima, esqueletos de proteína podem ser designados para revelação de peptídeos quando os peptídeos são transfor-

mados em plantas. Por meio de ilustração, citokinin oxidase (CKX) pode ser usada como um esqueleto de distribuição de peptídeo. Um membro da família de CKX derivada de milho (Morris, 1997) pode, por exemplo, ser usado como uma molécula de distribuição. CKX é endogenamente produzida, possui uma seqüência de sinal de peptídeo para secreção de células, e é suficientemente glicosilada para proporcionar estabilidade na presença de enzimas proteolíticas na região intracelular (Morri et al., 1999).

Baseado na estrutura tridimensional conhecida de CKX, conforme reportado por Malito et al., 2004, CKX pode ser projetada para revelar peptídeos em um terminal C exposto. Os construtos de esqueleto podem, por exemplo, ser expressos e secretados de levedura. Nos experimentos iniciais, a capacidade inibitória de peptídeos selecionados foi dramática, e 80-90% de encistamento de zoósporo foi obtido. Em controles de água, encistamento de zoósporos de *Phytophthora* foi 25% ou menos (Fang et al., 2004). Raízes de tomate peludo podem, por exemplo, serem produzidas usando-se estes construtos, e, em se fazendo isto, foi encontrado que os esqueletos de peptídeos são secretados na rizosfera, onde eles induzem encistamento de zoósporo antes deles se acumularem na superfície da raiz, bloqueando, desse modo, infecção. Isto é mostrado na figura 9.

Em adição à operação acima, mas pela expansão das mesmas técnicas, peptídeos 15-mer foram selecionados de bibliotecas combinatórias que se ligam fortemente a uredoesporos de *U. appendiculatus*. Este fungo foi usado como um substituto ou análogo selecionado para *P. pachyrhizi*, onde acesso a *P. pachyrhizi* é proximamente controlado para contaminante desta patogenia. Estas classificações identificaram um número de peptídeos que inibem crescimento após germinação de esporo inicial, por exemplo, conforme mostrado na Figura 10. Os peptídeos são eficazes em concentrações micromolares. O desenvolvimento de peptídeos de defesa em CKX pode capacitar distribuição para a superfície de hifais fungais que penetram o espaço intercelular de folhas.

### Exemplo 9

#### Metodologia de Seleção de Peptídeo

A figura 8 é um diagrama esquemático de processo mostrando um protocolo 800 para seleção de peptídeo. Para começar, uma biblioteca de peptídeo preparada por fago de partida pode ser misturada na etapa 802 com extratos de planta para remover peptídeos que interagem com proteínas de planta e outros fatores. A produção com tais peptídeos removidos é designada Sub-biblioteca 1.

A sub-biblioteca 1 é misturada 804 com uredoesporos germinados ou cistos recentemente germinados pelo qual é comumente conhecido como uma técnica de bioclassificação. Os peptídeos preparados por fago ligado são recuperados 806 dos cistos recentemente germinados. A concentração de cada peptídeo preparado por fago recuperado é aumentada por amplificação 808 em *E. coli*. Os peptídeos preparados por fago são recuperados 810 após amplificação, e misturados 812 com extratos de planta para novamente assegurar remoção de peptídeos que interagem com proteínas de planta e outros fatores. A produção com tais peptídeos removidos é designado Sub-biblioteca 2.

A etapa 814 determina se as etapas acima foram realizadas um número suficiente de vezes para assegurar estringência de seleção de peptídeos de defesa de planta candidatos. Começando com a Sub-biblioteca 2, Sub-bibliotecas 3, 4 e 5 são geradas por interações sucessivas n em que as etapas 806 a 812 são repetidas. Cada interação requer mistura da Sub-biblioteca mais recentemente gerada, por exemplo, Sub-biblioteca 2, com uredoesporos germinados ou cistos recentemente germinados com uso da técnica de bioclassificação. Os peptídeos preparados por fago ligado são recuperados a partir dos cistos recentemente germinados. A concentração de cada peptídeo preparado por fago recuperado é aumentada por amplificação em *E. coli*.

Uma vez que o processo tenha interado n vezes, de acordo com o desenho do processo, clones de fago aleatoriamente selecionados de Sub-biblioteca n (ou de qualquer outra de n Sub-bibliotecas) podem ser testados 816 para sua capacidade de inibir crescimento de cistos recentemente germinados, isto é, uredoesporos germinados. Os peptídeos candidatos que

mostram inibição bem-sucedida podem ser providos 818 como construtos de gene fundido que combinam os peptídeos de defesa de planta com um gene de proteína de superfície de planta, tal como CKX, amplificados 820 em um hospedeiro ínterim, tal como *Pichia*, e, eventualmente, usados para transformar 822 soja ou feijão de campo para conceder resistência à ferrugem.

Uma concretização específica do método precedente pode ser descrita no contexto de cinco partes, A a E.

A parte A requer a preparação de Sub-biblioteca 1 pela remoção de peptídeos que interagem com componentes de planta. Uma quantidade de 3,0 g de folha Pinto é misturada com 7 ml de tampão (20 mM de Tris-HCl, 5 nM de EDTA, pH 7,0), e a mistura é moída para proporcionar um homogenato. Em um micro tubo de 2 ml, 0,9 do homogenato é combinado com 0,1 ml de  $10^{14}$  fagos (f88-4/15-mer), para proporcionar um total de  $10^{13}$  virions. A mistura resultante é incubada à temperatura ambiente de cerca de 23 graus C por 30 minutos em um oscilador orbital (~500 rpm). A mistura incubada é centrifugada usando-se centrífuga convencional a velocidade superior por 5 minutos. O sobrenadante é recuperado, salvo, e centrifugado novamente. O sobrenadante é usado para amplificação de fago.

A parte B envolve uma primeira etapa de bioclassificação. Aproximadamente 1,5 milhão de esporos a partir de uma patogénia selecionada são incubados em 0,01% de Tween 20 e 25 ppm de B-ionona por 5 horas a 20 graus C. Adiciona-se  $10^{12}$  TU fagos. A mistura é dividida em dois microtubos, totalizando 3 ml em volume. Os microtubos, incluindo a mistura esporo/fago, são incubados à temperatura ambiente de cerca de 23 graus C) em um oscilador orbital (~500 rpm) por 30 minutos. A mistura incubada é centrifugada, o sobrenadante é removido, 0,5 ml de água é adicionado, e os teores remanescentes são combinados em um microtubo. Os materiais combinados são centrifugados, o sobrenadante é removido, e o pélete é lavado com 1 ml de água. Esta etapa de centrifugação com remoção de sobrenadante e lavagem é repetida dez vezes. Uma quantidade de 150 ul de tampão de eluição é adicionada ao pélete, que contém fago e esporo. O tampão de eluição é bem misturado, e a mistura repousa por 5 minutos à temperatura

ambiente. A mistura é, em seguida, centrifugada, e o sobrenadante é salvo. 75 ul de tampão de eluição é adicionado e misturado por centrifugação adicional como antes. Todo o sobrenadante é combinado. Isto é repetido usando-se 210 ul de tampão de eluição. Uma quantidade de 44 ul de Tris-HCl 1M (pH 9,0) é adicionada para neutralizar o sobrenadante eluído. O sobrenadante neutralizado é amplificado para produzir Sub-biblioteca 1.

A parte C requer a preparação de Sub-biblioteca 2. A sub-biblioteca 2 é produzida usando-se a Sub-biblioteca 1 amplificada a partir da primeira etapa de bioclassificação na Parte B. Isto é feito pelo uso da Sub-biblioteca 1 ao invés da biblioteca original f88-5/15-mer da Parte A, mas, de outro modo, seguindo a Parte A do protocolo.

A parte D requer a geração de Sub-bibliotecas adicionais pelo uso de etapas adicionais de bioclassificação incluindo as etapas 2, 3 e 4. A parte B é repetida três vezes:

1. Para a etapa 2 de bioclassificação,  $4,2 \times 10^{11}$  TU fagos a partir da segunda Sub-biblioteca são usados para produzir Sub-biblioteca 3;

2. Para a etapa 3 de bioclassificação,  $5,6 \times 10^{11}$  TU fagos amplificados a partir do segundo bioclassificação são usados para produzir Sub-biblioteca 4; e

3. Para a etapa 4 de bioclassificação,  $5,1 \times 10^{11}$  TU fagos amplificados a partir do terceiro bioclassificação são usados para produzir Sub-biblioteca 5.

As colônias da etapa 4 de bioclassificação são captadas, sequenciadas e testadas para inibição de crescimento de cisto recentemente germinado.

A parte E requer teste para inibição de crescimento de uredosporo. Incuba-se 30 ul de esporos germinados ( $\sim 250$ ) com  $3 \times 10^{12}$  a 20 graus C durante a noite. Acessa-se o crescimento de tubo de germe fungal (isto é, crescimento de cisto recentemente germinado), e compara-se com água e f88, isto é, fago somente sem qualquer peptídeo preparado, como controles.

#### Exemplo 10

Peptídeos que inibem crescimento de *Uromyces appendiculatus*,

e pelo bloqueio de desenvolvimento de germling (esporo germinado)

A metodologia do Exemplo 9 pode ser repetida para patogenias de *U. appendiculatus*. As Tabelas 3 e 4 mostram peptídeos que podem ser usados para inibir crescimento de uredosporos germinados (cistos recentemente germinados) a partir destas patogenias.

Tabela 3

Peptídeos mostrando forte inibição de crescimento de *U. appendiculatus*:

<u>Clone de fago-peptídeo</u>	<u>Seqüência</u>	<u>SEQ ID NO:</u>
Pp 15	ADPCHMPPRMPPPLPI	49
Pp 19	NHVSTLKTRHRLIPP	50
Pp 18	SSNAPPLSYPPLLVP	51
Pp 31	TMARPIPTFLPPPSL	52
Pp 6	TVAPTTHRHVYVWSMD	53
Pp 16	VFTPMNLSPPFMQPP	54

Tabela 4

Peptídeos mostrando média inibição de crescimento de *U. appendiculatus*:

<u>Clone de fago-peptídeo</u>	<u>Seqüência</u>	<u>SEQ ID NO:</u>
Pp 55	AAGPNIPPPHRASTW	55
Pp 28	AHLYSGASLYRVYRS	56
Pp 56	GPPSILLAIGTSLT	57
Pp 50	LSSPYACALFVVKGA	58
Pp 39	RGWSVSHHSLMPVP	59
Pp 21	RSTASPQALNPLVAS	60
Pp 53	SLFFEVSRLVRLLS	61
Pp 2	SRWWRVCYMTQPCTI	62
Pp 37	VVALRWGWSPLRPPG	63

### 10 Exemplo 11

Uso de citocinin oxidase como um esqueleto de proteína para distribuição de peptídeos selecionados em pontos de infecção de *U. appendiculatus* de tecidos de feijão (*Phaseolus vulgaris*).

CKX é modificado conforme descrito acima para fundir os peptídeos de defesa das Tabelas 3 e 4. Uma transformação mediada por agrobacterium de *Phaseolus vulgaris* é realizada para proporcionar uma planta que expressa cada peptídeo. As plantas transformadas são expostas a *U. appendiculatus*. A taxa e severidade de infecção são comparadas a uma planta de controle para confirmar eficácia dos peptídeos de defesa contra a

### 20 Exemplo 12

Uso de citocinin oxidase como um esqueleto de proteína para distribuição de peptídeos selecionados em pontos de infecção de *P. pachyrhizi* de tecidos de soja (*Glycine Max*).

5 CKX é modificado conforme descrito acima para fundir os peptídeos de defesa das Tabelas 3 e 4. Uma transformação mediada por agrobacterium de soja é realizada para proporcionar uma planta que expressa cada peptídeo. As plantas transformadas são expostas a *P. pachyrhizi*. A taxa e severidade de infecção são comparadas a uma planta de controle para confirmar eficácia dos peptídeos de defesa contra a patogenia.

## 10 Conclusão

À luz da descrição detalhada da invenção e dos exemplos apresentados acima, pode ser apropriado que os vários aspectos da invenção são alcançados.

15 É para ser compreendido que a presente invenção foi descrita em detalhes por meio de ilustração e exemplo, de modo a informar outros versados na técnica com a invenção, seus princípios, e sua aplicação prática. Formulações particulares e processos da presente invenção não são limitados às descrições das concretizações específicas apresentadas, mas preferivelmente as descrições e exemplos devem ser vistas em termos das reivindicações que se segue, e suas equivalentes. Enquanto alguns dos e-  
20 xemplos e descrições acima incluem algumas conclusões sobre o modo que a invenção pode funcionar, os inventores não pretendem estarem ligados por estas conclusões e funções, mas apenas colocar as explanações o máximo possível.

25 É para ser adicionalmente compreendido que as concretizações específicas da presente invenção, conforme colocada, não são pretendidas como sendo exaustiva e limitante da invenção, e que muitas alternativas, modificações e variações serão aparentes àqueles versados na técnica à luz dos exemplos precedentes e descrição detalhada. Conseqüentemente, esta  
30 invenção é pretendida para envolver todas tais alternativas, modificações e variações que caem dentro do espírito e escopo das reivindicações que se seguem.

Listagem de Referências

Os seguintes documentos são por isso incorporados como referência na mesma extensão como inteiramente descrito neste:

- Barbas, C.F., III, Burton, D.R., Scott, J.K., Sliverman, G.J. (2001). Phage Display. A Laboratory Manual. Cold Spring harbor Laboratory Press.
- Bishop-Hurley, S. L., Schmidt, F.J., Erwin, A.L., and Smith, A.L. (2005). Peptides Selected for Binding to a Virulent Strain of *Haemophilus influenzae* by Phage Display Are Bactericidal. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:2972-2978.
- Bishop-Hurley, S., Schmidt, F.J., Smith, G.P., Morris, R.O., Elder, J., Roop, P., and English, J.T. 2002. Phage display peptides that disrupt life-stage progression in *Phytophthora*. *App. Env. Micro.* 68:3315-3320.
- Bonde, M.R., Melching, J.S., and Bromfield, K.R. 1976. Histology of the susceptible pathogen relationship between *Glycine max* and *Phakopsora pachyrhizi*, the cause of soybean rust. *Phytopathology* 66:1290-1294.
- Cwirla, S.E., Peters, E.A., Barrett, R.W., and Dower, W.J. (1990). Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382.
- Fang, Z., Mounter, S. Simon, M., Schmidt, F.J., and English, J.T. (2004). Protein scaffold design for delivery of peptides that induce encystment of *Phytophthora capsici* zoospores. Abstract presented at the NSF *Phytophthora* Molecular Genetics Workshop. New Orleans, LA.
- Healy, J.M., Murayama, O., Maeda, T., Yoshino, K., Sekiguchi, K., and Kikuchi, M. (1995). Peptide ligands for integrin  $\alpha 5 \beta 1$  selected from random phage display libraries. *Biochemistry* 34:3948-3955.
- Hollier, C.A., and King. S.B. 1985. Effects of temperature and relative humidity on germinability and infectivity of *Puccinia polysora* uredospores. *Plant Dis.* 69:937-939.
- Koch, E., and Hoppe, H.H. 1988. Development of infection structures by the direct-penetrating soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) On artificial membranes. *J. Phytopathol.* 122:232-244.
- Koivunen, E., Gay, D.A., Ruoslahti, E. (1993). Selection of peptides binding to the  $\alpha 5 \beta 1$  integrin from phage display library. *J. Biol. Chem.* 268:20205-20210

- Koivunen, E., Wang, B., and Ruoslahti, E. (1994). Isolation of a highly specific ligand for the  $\alpha 5 \beta 1$  integrin from phage display library. *J. Cell Biol.* 124:373-380.
- Laskey, J.T., Bishop-Hurley, S., Mounter, S.A., English, J.T., and Schmidt, F.J. (200). Phage-display peptides that disrupt developmental progression of *Phytophthora* species. *Phytopathology* 91: S53.
- Morris, R.O. 1997. Hormonal regulation of seed development. pp117-149 in: Larkins, B.A., and Vasil, I.K., eds. *Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development*. Kluwer Academic Publ., Boston.
- Morris R.O., Bilyeu K.D., Laskey J.G., Cheikh N.N. (1999) Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 255: 328-333
- O'Neil, K.T., Hoess, R.H., Jackson, S.A., Ramachandran, N.S., Mousa, S.A., and DeGrado, W.F. (1992). Identification of novel peptide antagonists for GPIIb/IIIa from a conformationally constrained phage display library. *Proteins* 14:509-515.
- Pasqualini, R., Koivunen, E., Ruoslahti, E. (1995). A peptide isolated from phage display libraries is a structural mimic of an RGE-binding site on integrins. *J. Cell Biol.* 130:1189-1196.
- Pasqualini, R., and Ruoslahti, E. 1996. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature*. 380:364-366.
- Rizvi, A. 2004. Soybean Rust Colloquium, Annual Meeting of the Southern Soybean Disease Workers, St. Louis, MO.
- Scott, J.K., and Smith, G.P. (1990). Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 249:386-390.
- Smith, J.W., Hu, D., Satterthwait, A., Pinz-Sweeney, S., and Barbas III, C.F. (1994). Building synthetic antibodies as adhesive ligands for integrins. *J. Biol. Chem.* 269:32788-32795.
- Wilson, D.R., and Finlay, B.B. 1998. Phage display: applications, innovations, and issues in phage and host biology. *Can. J. Microbiol.* 44:313-329.

## Listagem de Seqüência de Conteúdo Livre

- <110> University of Missouri  
ENGLISH, JAMES T  
SCHMIDT, FRANCIS J  
STACEY, GARY  
ZHIWEI, FANG
- <120> "MÉTODO PARA IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS, POLINUCLEOTÍDEO, VETOR RE-COMBINANTE, CÉLULA, PLANTA E MÉTODOS PARA SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS E PARA CONFERIR EM UMA PLANTA A CAPACIDADE DE RESISTIR À INFECÇÃO CAUSADA POR FUNGOS"
- <130> Matter 438962
- <150> 10/829,549  
<151> 2001-04-10
- <150> 60/195,785  
<151> 2000-04-10
- <160> 63
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1  
<211> 33  
<212> PRT  
<213> Bacteriófago filamentosso tipo 88
- <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (9)..(23)  
<223> X é algum aminoácido codificado pelo códon NNK onde N é A, T, C ou G e K designa G ou T
- <400> 1
- Leu Val Pro Met Leu Ser Phe Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1                   5                   10                   15
- Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Ala Glu Gly Asp Asp Pro Ala Lys  
                  20                   25                   30
- Ala
- <210> 2  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial
- <220>  
<223> Iniciador

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(20)  
 <223> Iniciador

<400> 2  
 ggaaccottta attgtatcgg

<210> 3  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Iniciador

<400> 3  
 agtagcagaa gcctgaaga  
 19

<210> 4  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 4

Ala Ala Pro Asp Leu Gln Asp Ala Met  
 1 5

<210> 5  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 5

Ala Asp Arg Leu Asn Ser Asp Ala Gly  
 1 5

<210> 6  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 6

Ala Asp Arg Pro Ser Thr Thr Ser Leu  
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 7

Ala Asp Pro Pro Arg Thr Val Ser Thr  
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 8

Ala Asp Arg Pro Ser Met Ser Pro Thr  
1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 9

Ala Asp Arg Thr Ser Asn Ala Ser Thr  
1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 10

Ala Asp Lys Ser Tyr Ile Pro Ser Ser  
1 5

<210> 11  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 11

Ala Val Arg Asn Pro Ser His His Ser  
 1 5

<210> 12  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 12

Ala Asp Pro Thr Pro Arg Gly His Ser  
 1 5

<210> 13  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 13

Ala Asp Pro Thr Arg Gln Pro His Ser  
 1 5

<210> 14  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 14

Ala Glu His Gln Asn Ser Ala Gly Pro  
 1 5

<210> 15  
 <211> 10

<212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 15

Ala Asp Ala Arg Ser Ala Gly Ala Ile Ser  
 1                    5                    10

<210> 16  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 16

Ala Asp Ser Lys Asn Ala Gly Pro Met  
 1                    5

<210> 17  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 17

Ala Glu Thr Lys Phe Ser Gly Ser Ala  
 1                    5

<210> 18  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 18

Ala Asp Pro Lys Gly Ser Gly Val Thr  
 1                    5

<210> 19  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>

<223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 19

Ala Gly Leu Thr Ser Pro Asn Asp Met  
1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 20

Ala Asp Ile Thr Asp Pro Met Gly Ala  
1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 21

Ala Val Gly Thr His Thr Pro Asp Ser  
1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 22

Ala Val Ser Pro Asn Val His Asp Gly  
1 5

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 23



<400> 27

Ser Ala Thr Asp Thr Thr Leu Pro Met Met Thr Ala Ile Arg Ser  
1 5 10 15

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inserção de peptídeo aleatória

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> x= aminoácido desconhecido

<400> 28

Thr Arg Leu Ser Pro Met Glu Ser Xaa Ala Met Leu Leu Ala Pro  
1 5 10 15

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 29

Leu Leu Pro Val Ser Pro Pro Phe Ala Pro Asn Ala Ser Ser Thr  
1 5 10 15

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 30

Met Ser Asn Phe Pro Thr Ser His Ala Pro Cys Pro Val Glu Ile  
1 5 10 15

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 31

Glu Phe Arg Lys Asn Tyr Pro Ser Ala Ala Pro Leu Ile Pro Arg  
1 5 10 15

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inserção de peptídeo aleatória

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> x= aminoácido desconhecido

<400> 32

Pro Xaa Val His Gly Ser Ile Pro Leu Thr Pro Pro Leu Gly Phe  
1 5 10 15

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inserção de peptídeo aleatória

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> x= aminoácido desconhecido

<400> 33

Leu Phe Xaa Cys Tyr Pro Pro Cys Thr Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser  
1 5 10 15

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inserção de peptídeo aleatória

<220>

<221> VARIANTE

<222> (14)..(14)

<223> x= aminoácido desconhecido

<400> 34

Met Ser Asn Phe Pro Thr Ser His Ala Pro Cys Pro Val Xaa Ile  
1 5 10 15

<210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 35

Pro Glu Trp Lys Ser Ser Trp Ser Pro Cys Thr Pro Arg Cys Pro  
1 5 10 15

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inserção de peptídeo aleatória

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> x é M ou I

<400> 36

Ala Met Ser Arg Trp Leu Arg Pro Arg Glu Xaa Asn Ala Pro Pro  
1 5 10 15

<210> 37

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inserção de peptídeo aleatória

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> x= peptídeo desconhecido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> x= peptídeo desconhecido

<400> 37

Thr His Thr Thr Phe Xaa Val Thr Val Xaa Leu His Glu Pro Pro  
1 5 10 15

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inserção de peptídeo aleatória

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> x= peptídeo desconhecido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> x= peptídeo desconhecido

<400> 38

Thr His Thr Thr Phe Xaa Val Thr Val Xaa Leu His Glu Pro Pro  
1 5 10 15

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 39

Pro Thr Leu Gly Arg Phe Asn Arg Pro Ser Cys Ser Ile Ile Val  
1 5 10 15

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 40

Ala Pro Gln Cys His Pro His Leu Pro Phe Asp Met Ile His Val  
1 5 10 15

<210> 41  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Inserção de peptídeo aleatória

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> x= peptídeo desconhecido

<400> 41

Asn His Asn Ser Leu Pro Ala Gln Tyr Leu Val Xaa Ile Leu Arg  
 1                    5                    10                    15

<210> 42  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 42

Asp Gln Pro Cys Thr Pro Ser Pro Asp Val Ser Phe Tyr Arg Ser  
 1                    5                    10                    15

<210> 43  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 43

Val Ala Ala Pro Ser His Trp Leu Lys Pro Ser Leu Asp Cys Phe  
 1                    5                    10                    15

<210> 44  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 44

Asn Pro Leu Tyr Lys Asn Pro Pro Pro Arg Val Ala Met Cys Leu  
 1                    5                    10                    15



<220>  
 <221> DOMÍNIO  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Ligante

<220>  
 <221> DOMÍNIO  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Peptídeo aleatório Pc 87

<400> 48

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser  
 1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln  
 20 25 30

Ile Pro Ala Asp Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe  
 35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu  
 50 55 60

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val  
 65 70 75 80

Ser Leu Glu Lys Arg Leu Ala Ala Gly Thr Pro Ala Leu Gly Asp Asp  
 85 90 95

Arg Gly Arg Pro Trp Pro Ala Ser Leu Ala Ala Leu Ala Leu Asp Gly  
 100 105 110

Lys Leu Arg Thr Asp Ser Asn Ala Thr Ala Ala Ala Ser Thr Asp Phe  
 115 120 125

Gly Asn Ile Thr Ser Ala Leu Pro Ala Ala Val Leu Tyr Pro Ser Thr  
 130 135 140

Gly Asp Leu Val Ala Leu Leu Ser Ala Ala Asn Ser Thr Pro Gly Trp  
 145 150 155 160

Pro Tyr Thr Ile Ala Phe Arg Gly Arg Gly His Ser Leu Met Gly Gln  
 165 170 175

Ala Phe Ala Pro Gly Gly Val Val Val Asn Met Ala Ser Leu Gly Asp  
 180 185 190

Ala Ala Ala Pro Pro Arg Ile Asn Val Ser Ala Asp Gly Arg Tyr Val  
195 200 205

Asp Ala Gly Gly Glu Gln Val Trp Ile Asp Val Leu Arg Ala Ser Leu  
210 215 220

Ala Arg Gly Val Ala Pro Arg Ser Trp Asn Asp Tyr Leu Tyr Leu Thr  
225 230 235 240

Val Gly Gly Thr Leu Ser Asn Ala Gly Ile Ser Gly Gln Ala Phe Arg  
245 250 255

His Gly Pro Gln Ile Ser Asn Val Leu Glu Met Asp Val Ile Thr Gly  
260 265 270

His Gly Glu Met Val Thr Cys Ser Lys Gln Leu Asn Ala Asp Leu Phe  
275 280 285

Asp Ala Val Leu Gly Gly Leu Gly Gln Phe Gly Val Ile Thr Arg Ala  
290 295 300

Arg Ile Ala Val Glu Pro Ala Pro Ala Arg Ala Arg Trp Val Arg Phe  
305 310 315 320

Val Tyr Thr Asp Phe Ala Ala Phe Ser Ala Asp Gln Glu Arg Leu Thr  
325 330 335

Ala Pro Arg Pro Gly Gly Gly Gly Ala Ser Phe Gly Pro Met Ser Tyr  
340 345 350

Val Glu Gly Ser Val Phe Val Asn Gln Ser Leu Ala Thr Asp Leu Ala  
355 360 365

Asn Thr Gly Phe Phe Thr Asp Ala Asp Val Ala Arg Ile Val Ala Leu  
370 375 380

Ala Gly Glu Arg Asn Ala Thr Thr Val Tyr Ser Ile Glu Ala Thr Leu  
385 390 395 400

Asn Tyr Asp Asn Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ala Val Asp Gln Glu Leu  
405 410 415

Ala Ser Val Leu Gly Thr Leu Ser Tyr Val Glu Gly Phe Ala Phe Gln  
420 425 430

Arg Asp Val Ala Tyr Ala Ala Phe Leu Asp Arg Val His Gly Glu Glu  
435 440 445

Val Ala Leu Asn Lys Leu Gly Leu Trp Arg Val Pro His Pro Trp Leu  
450 455 460

Asn Met Phe Val Pro Arg Ser Arg Ile Ala Asp Phe Asp Arg Gly Val  
465 470 475 480

Phe Lys Gly Ile Leu Gln Gly Thr Asp Ile Val Gly Pro Leu Ile Val  
485 490 495

Tyr Pro Leu Asn Lys Ser Met Trp Asp Asp Gly Met Ser Ala Ala Thr  
500 505 510

Pro Ser Glu Asp Val Phe Tyr Ala Val Ser Leu Leu Phe Ser Ser Val  
515 520 525

Ala Pro Asn Asp Leu Ala Arg Leu Gln Glu Gln Asn Arg Arg Ile Leu  
530 535 540

Arg Phe Cys Asp Leu Ala Gly Ile Gln Tyr Lys Thr Tyr Leu Ala Arg  
545 550 555 560

His Thr Asp Arg Ser Asp Trp Val Arg His Phe Gly Ala Ala Lys Trp  
565 570 575

Asn Arg Phe Val Glu Met Lys Asn Lys Tyr Asp Pro Lys Arg Leu Leu  
580 585 590

Ser Pro Gly Gln Asp Ile Phe Asn Lys Leu Ala Asp Arg Pro Ser Met  
595 600 605

Ser Pro Thr  
610

<210> 49  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 49

Ala Asp Pro Cys His Met Pro Pro Arg Met Pro Pro Leu Pro Ile



<211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 54

Val Phe Thr Pro Met Asn Leu Ser Pro Pro Phe Met Gln Pro Pro  
 1                    5                    10                    15

<210> 55  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 55

Ala Ala Gly Pro Asn Ile Pro Pro Pro His Arg Ala Ser Thr Trp  
 1                    5                    10                    15

<210> 56  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 56

Ala His Leu Tyr Ser Gly Ala Ser Leu Tyr Arg Val Tyr Arg Ser  
 1                    5                    10                    15

<210> 57  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 57

Gly Pro Pro Ser Ile Leu Leu Ala Ile Gly Thr Leu Ser Leu Thr  
 1                    5                    10                    15

<210> 58  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 58

Leu Ser Ser Pro Tyr Ala Cys Ala Leu Phe Val Val Lys Gly Ala  
 1 5 10 15

<210> 59  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 59

Arg Gly Trp Ser Val Ser His His Ser Leu Leu Met Pro Val Pro  
 1 5 10 15

<210> 60  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 60

Arg Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Leu Asn Pro Leu Val Ala Ser  
 1 5 10 15

<210> 61  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 61

Ser Leu Phe Phe Glu Val Ser Arg Met Leu Val Arg Leu Leu Ser  
 1 5 10 15

<210> 62  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 62

Ser	Arg	Trp	Trp	Arg	Cys	Val	Thr	Met	Thr	Gln	Pro	Cys	Thr	Thr
1				5					10					15

<210> 63  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Inserção de peptídeo aleatória

<400> 63

Val	Val	Ala	Leu	Arg	Trp	Gly	Trp	Ser	Pro	Leu	Arg	Pro	Pro	Gly
1				5					10					15

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para identificação de peptídeos não-imunoglobulínicos tendo uma afinidade para a superfície de fungos, caracterizado pelo fato de que compreende:

5 (a) construção de uma biblioteca de peptídeos por,  
(i) preparação de oligonucleotídeos aleatórios;  
(ii) inserção dos referidos oligonucleotídeos aleatórios em um vetor que expressa peptídeos codificados pelos referidos oligonucleotídeos aleatórios em sua superfície, e é capaz de transfectar uma célula hospedeira;

10 (iii) transfectar uma célula hospedeira apropriada com o referido vetor para amplificar o referido vetor em uma forma infecciosa para criar uma biblioteca de peptídeos na superfície do referido vetor;

(b) colocar em contato o referido vetor que expressa a referida biblioteca de peptídeo com um fungo-alvo pertencendo a um gênero selecionado de um grupo consistindo em *Phakapsona* e *Uronyces*, e remover do vetor não-ligado;

(c) eluição do vetor ligado dos referidos fungos;

(d) amplificação de referido vetor ligado;

20 (e) seqüenciamento dos oligonucleotídeos candidatos contidos no referido vetor eluído;

(f) determinação da seqüência de aminoácido de peptídeos codificados pelos referidos oligonucleotídeos candidatos contidos no referido vetor eluído; e

25 (g) seleção dos peptídeos não-imunoglobulínicos para os quais a seqüência de aminoácido foi determinada.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente repetição das etapas (b) a (d) pelo menos uma vez.

30 3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o fungo-alvo compreende *Phakopsora pachyrhizi*.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo

fato de que o fungo-alvo compreende *Uromyces appendiculatus*.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido vetor é posto em contato com o referido fungo-alvo em estágios de vida diferentes do referido fungo.

5 6. Método de acordo com a reivindicação 5, o referido estágio de vida é o estágio de vida de zoosporo ou o estágio de vida de germinação.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido vetor é um vetor de fusão de fago.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo  
10 fato de que o referido peptídeo é expresso como parte de uma proteína de revestimento do referido vetor.

9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os referidos oligonucleotídeos aleatórios codificam peptídeos contendo de 6 a 15 aminoácidos.

15 10. Polinucleotídeo caracterizado pelo fato de que compreende uma primeira seqüência codificante, um peptídeo de defesa de planta selecionado a partir do grupo consistindo na SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ  
20 ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63 e combinações destas.

11. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente uma segunda seqüência codificante, codificando um segundo polipeptídeo, em que o referido segundo polipeptídeo quando expresso é fixado ao referido peptídeo de defesa da  
25 planta.

12. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o segundo polipeptídeo compreende um membro das proteínas ou seus fragmentos da família CKX.

30 13. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a primeira seqüência codificante, codifica o peptídeo da SEQ ID NO: 50.

14. Vetor recombinante, caracterizado pelo fato de que compreende o polinucleotídeo como definido na reivindicação 10.

15. Célula, caracterizada pelo fato de que compreende o polinucleotídeo como definido na reivindicação 10, o referido polinucleotídeo tendo sido introduzido na referida célula por transformação.

16. Planta, caracterizada pelo fato de que compreende polinucleotídeo como definido na reivindicação 10, o referido polinucleotídeo tendo sido introduzido na referida planta por transformação.

17. Método para seleção de peptídeos para a capacidade de afetar o desenvolvimento de um fundo caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) construção de uma biblioteca de peptídeos por,  
(i) preparação de oligonucleotídeos aleatórios;  
(ii) inserção dos referidos oligonucleotídeos aleatórios em um vetor apropriado que expressa peptídeos codificados por referidos oligonucleotídeos aleatórios em sua superfície, e é capaz de transfectar uma célula hospedeira;

(iii) transfectar uma célula hospedeira apropriada com o referido vetor para amplificar referido vetor em uma forma infecciosa para criar uma biblioteca de peptídeos na superfície de referido vetor;

(b) colocar em contato o referido vetor que expressa a referida biblioteca de peptídeo com um fungo-alvo, e remover o vetor não-ligado;

(c) eluição dos vetores ligados dos referidos fungos;

(d) amplificação dos referidos vetores ligados;

(e) isolamento dos oligonucleotídeos candidatos contidos nos referidos vetores eluídos;

(f) produção dos peptídeos codificados pelos referidos oligonucleotídeos candidatos;

(g) colocar em contato os referidos peptídeos com um fungo-alvo; e

(h) determinação do efeito dos referidos peptídeos no crescimento do referido fungo.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente repetição de (b) a (d) pelo menos uma vez.

5 19. Método para conferir em uma planta a capacidade de resistir à infecção causada por fungos, caracterizado pelo fato de que compreende: (a) introduzir em uma planta um polinucleotídeo compreendendo uma primeira seqüência codificante codificando um peptídeo de defesa da planta; (b) permitir que o referido peptídeo de defesa da planta seja expresso na referida planta para executar a função antifúngica ao referido peptídeo de defesa.

10 20. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a planta é soja.

21. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo é introduzido na planta por transformação.

15 22. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo compreende adicionalmente uma segunda seqüência codificante codificando um esqueleto de distribuição de peptídeo facilitando a distribuição e/ou apresentação do peptídeo de defesa da planta.

20 23. Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o esqueleto de distribuição de peptídeo é um membro das proteínas ou seus fragmentos da família CKY.

24. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a primeira seqüência codificante codifica pelo menos um peptídeo de defesa da planta selecionado do grupo que consistindo na SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, 25 SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, e combinações destes.

25. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a primeira seqüência codificante codifica o peptídeo da SEQ 30 ID NO: 50.

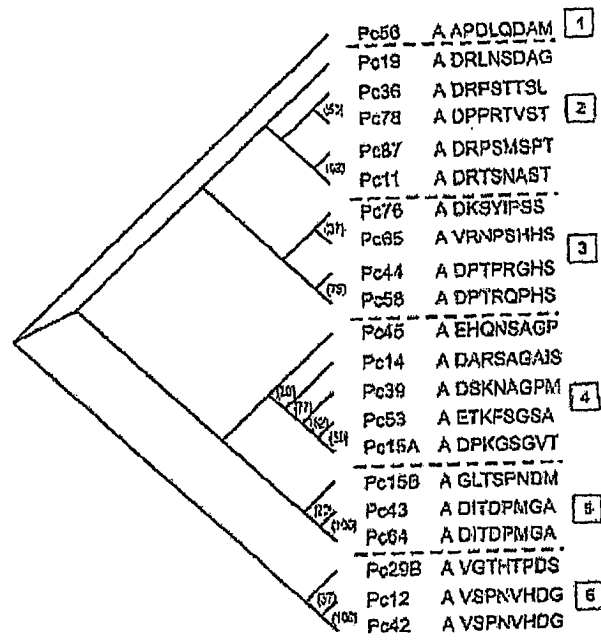


FIG. 1

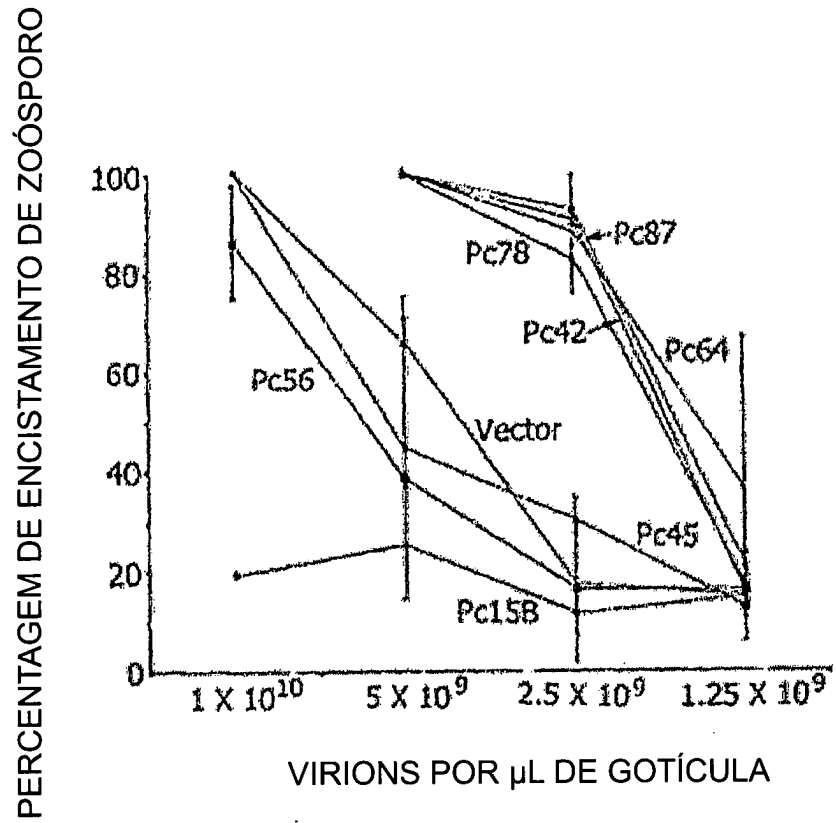


FIG. 2

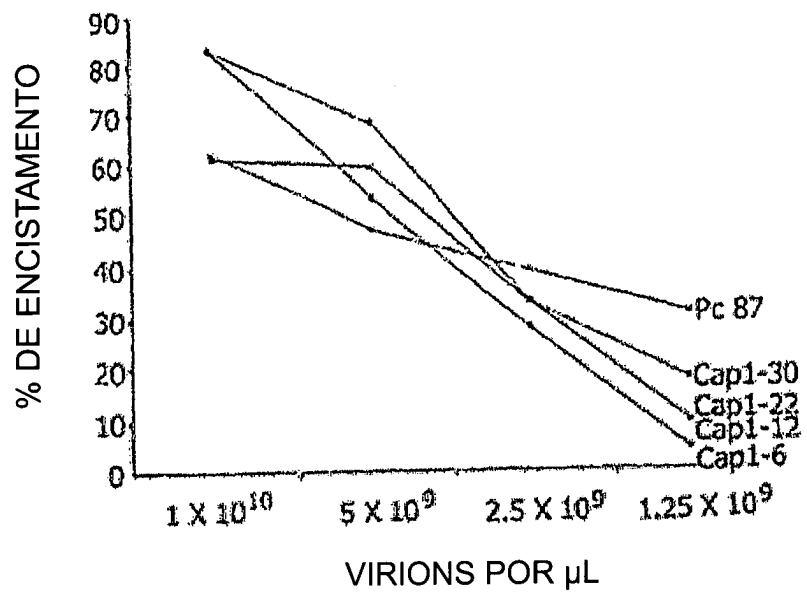
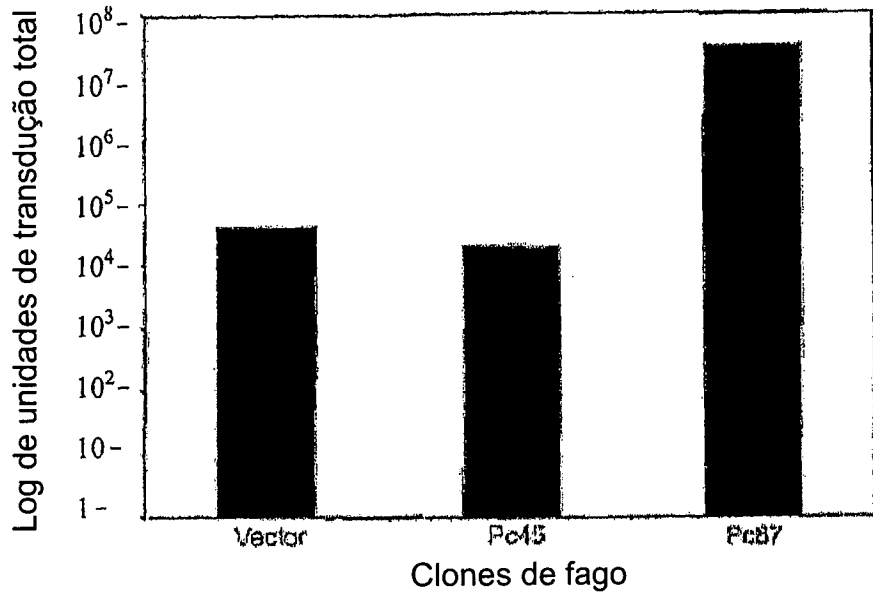


FIG. 3



**FIG. 4**

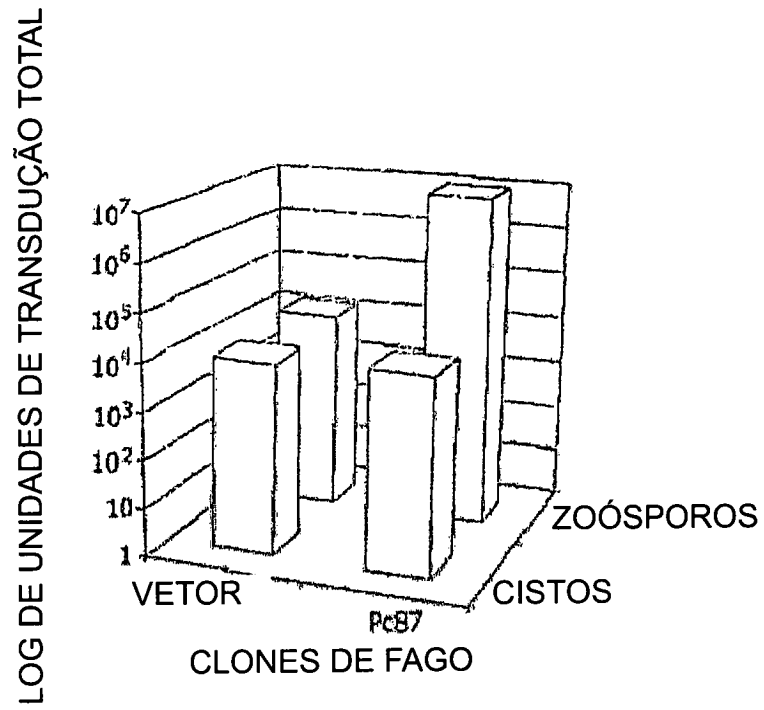
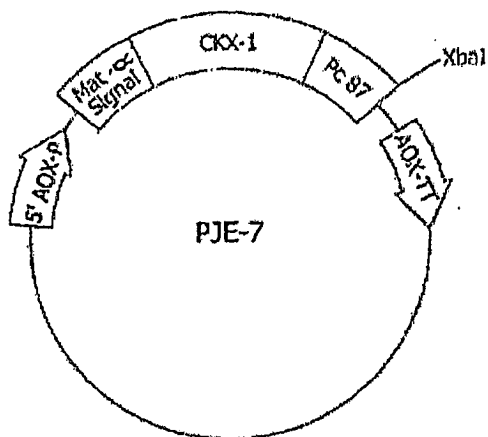


FIG. 5



5' AG CTA GCA GAT AGA CCA TCA ATG TCA CCA ACA TAG T 3'  
 3' T CGT CTA TCT GGT AGT TAC AGT GGT TGT ATC AGA TC 5'

FIG. 6

MRFFSIFTAV LFAASSALAA PVNTTTEDET AQIPADAVIG YSDLEGDFDV  
AVLFFSNSTN NGLLEFINTI ASIAAKKEEV BLEKRLAAGT PALGDDRGRF  
 WPASLAALAL DGKLRDTSNA TAAASTDFGN ITSAALPAVL YPSTGDLVAL  
 LSAANSTPGW PYTIFRGRG HSLMGQAFAP GGUVVNMAQL QDAAADPRIN  
 VSADGRYVDA GGEQWIDVL RASLARGVAP RSWNDYLYLT VGCTLSNAGI  
 SCQAFRHGPQ ISNVLEMDVI TGHGEMVICS KQLNADLFDA VLEGLGQFGV  
 ITRARIAVEP APARARWRF VYTDFAAFSA DQERLTAPRF GGGGASFGPM  
 SYVEGSVFN QSLATDLANT GFPTDADVAR IVALAGERNA TTVYSIEATL  
 NYDNATAAAA AVDQELASVL GTLOYVEGFA FQRDVAYAAF LDRVHGEEVA  
 LNKLGLRVP HPWLNMFVPR SRIADFDRGV FKGILQGTDI VGPLIYPLN  
 KSMWDDGMSA ATRSEDVFA VELLEFSVAP NDLARLQEQN RRILRFCDLA  
 GIQYKTYLAR HTDRSDWVRH FGAAKNRPV EMKNKYDFKR LLSPGQDIFN  
KLADKPSMSP F

FIG. 7

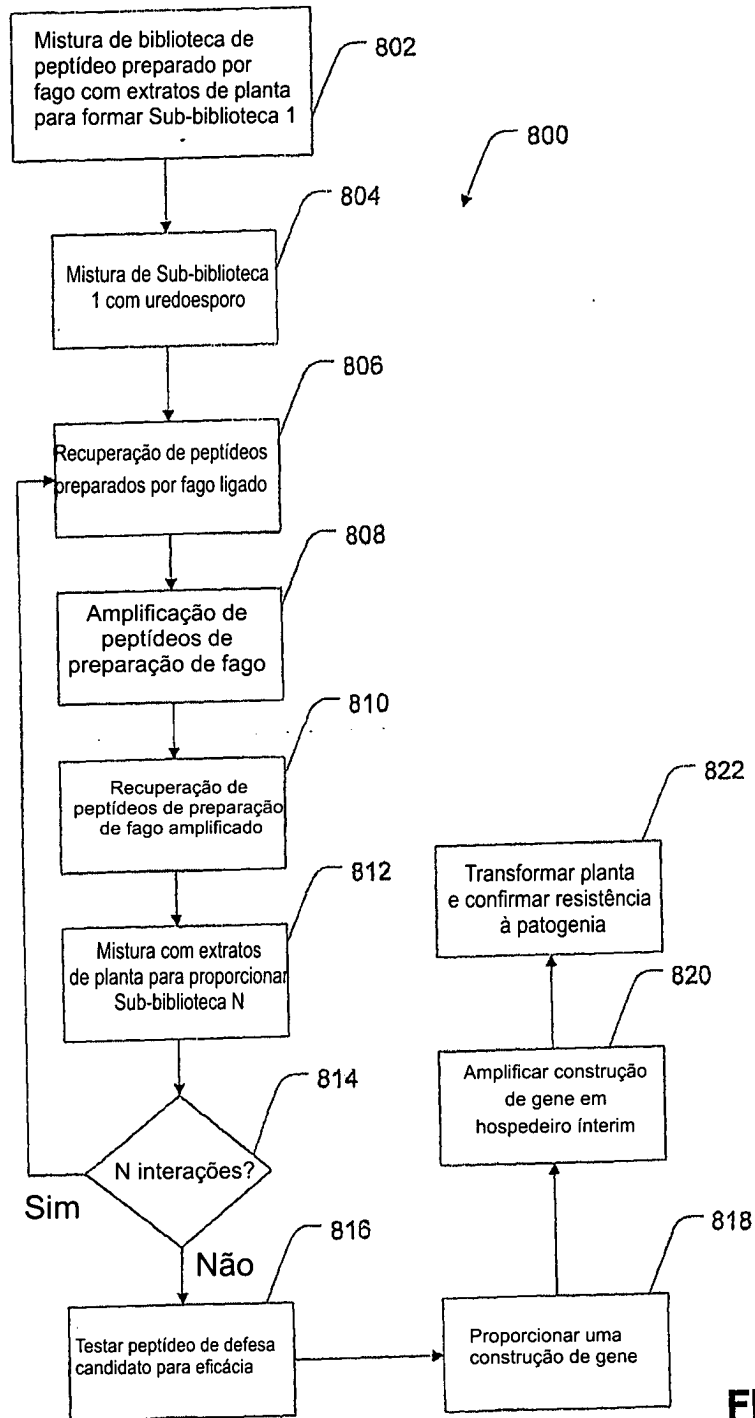
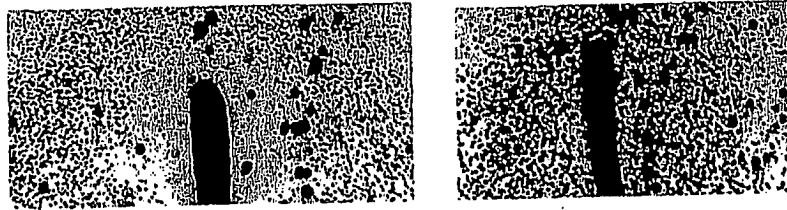


FIG. 8



**FIG. 9**



**FIG. 10**

**RESUMO**

Patente de Invenção: "MÉTODO PARA IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS, POLINUCLEOTÍDEO, VETOR RECOMBINANTE, CÉLULA, PLANTA E MÉTODOS PARA SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS E PARA CONFERIR EM  
5 UMA PLANTA A CAPACIDADE DE RESISTIR À INFECÇÃO CAUSADA POR FUNGOS".

A presente invenção refere-se a um método para a identificação de peptídeos tendo uma afinidade para a superfície de fungos é provido, sendo este um método para identificação de peptídeos capazes de afetar o  
10 desenvolvimento de um fungo. Também são providas composições compreendendo peptídeos identificados usando-se o método da presente invenção. Em adição, polinucleotídeos isolados, vetores, cassetes de expressão e células transformadas, capazes de expressar peptídeos identificados pelo método da presente invenção, são providos.