



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0820114-5 B1



(22) Data do Depósito: 21/11/2008

(45) Data de Concessão: 04/10/2022

(54) Título: MÉTODO DE AUMENTAR A SENSIBILIDADE DE UMA FITASE DERIVADA DE ESCHERICHIA COLI A UMA PEPSINA

(51) Int.Cl.: A23K 20/189; A23K 50/75; C12N 9/16.

(52) CPC: A23K 20/189; A23K 50/75; C12N 9/16.

(30) Prioridade Unionista: 03/12/2007 US 60/991,968.

(73) Titular(es): SYNGENTA PARTICIPATIONS AG.

(72) Inventor(es): SHIB SANKAR BASU; SHENGSHENG ZHANG.

(86) Pedido PCT: PCT US2008084303 de 21/11/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/073399 de 11/06/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 02/06/2010

(57) Resumo: ENGENHARIA DE PROTEÍNAS ENZIMATICAMENTE SUSCETÍVEIS. A invenção refere-se um polipeptídeos fitase sintético o qual codifica uma fitase enzimaticamente suscetível. Também são proporcionados produtos de rações ou alimentos compreendendo uma fitase enzimaticamente suscetível, e plantas transgênicas as quais expressam a enzima fitase enzimaticamente suscetível. Também são proporcionados métodos para fabricar e usar fitases enzimaticamente suscetíveis, por exemplo, um método de usar uma fitase enzimaticamente suscetível em processamento de rações e alimentos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODO DE AUMENTAR A SENSIBILIDADE DE UMA FITASE DERIVADA DE *ESCHERICHIA COLI* A UMA PEPSINA"**.

Campo da Invenção

5 A presente invenção refere-se de modo geral ao campo da biologia molecular, biologia computacional, e mais especificamente, a métodos de engenharia de proteínas por design racional para gerar proteínas com maior suscetibilidade enzimática.

Antecedentes da Invenção

10 Os processos industriais frequentemente requerem a adição de proteínas para desempenhar uma função específica dentro de um processo. Cresce a demanda por proteínas com características novas ou diferentes à medida que os processos industriais evoluem e se tornam mais eficientes. Um método para desenvolver proteínas com novas características é proces-

15 sar proteínas usadas atualmente para conter novas características, e deste modo criar novas variantes da proteína. A engenharia de proteínas tem se focalizado sobre o desenvolvimento de termotolerância em muitas enzimas. O presente requerimento descreve o uso de técnicas de engenharia de proteínas para processar variantes enzimaticamente suscetíveis de uma proteí-

20 na. Os métodos descritos podem ser usados sobre uma variedade de proteínas. Além disso, os métodos descritos podem ser usados para produzir suscetibilidade enzimática para uma ampla variedade de proteases.

Sumário da Invenção

É descrito um método de engenharia de proteínas com aumento

25 de suscetibilidade a uma protease. A engenharia de proteínas por design racional se baseia no modelo estrutural tridimensional de uma proteína e subsequente identificação de domínios de proteínas que podem ser alterados sem efeitos prejudiciais sobre sítios de ligação, sítios ativos e estrutura tridimensional global. Qualquer proteína pode ser processada para aumento

30 da suscetibilidade a qualquer protease.

Descrição Detalhada da Invenção

Processos industriais usam proteínas como um componente de

fabricação. Proteínas que são enzimas são particularmente úteis como componentes em processos industriais uma vez que catalisam reações que convertem um substrato de uma forma em outra. As características de uma proteína e, em particular, o perfil de atividade (isto é, temperatura ótima, pH, concentração de sais, íons, e etc.) de uma enzima contribuem para a utilidade de uma proteína de um processo particular. À medida que se desenvolvem novos processos industriais, há uma demanda crescente por proteínas com características alteradas. As novas características buscadas podem ser além do conjunto de características das proteínas atuais ou possam envolver alteração de uma característica. Características de proteínas podem incluir, mas não estão limitadas às características do perfil de atividade, capacidade de absorver água, capacidade de evitar a absorção de água, capacidade de gelificação, e etc. Por exemplo, pode ser desejável produzir uma proteína que apresente termotolerância e estabilidade ácida com a característica adicional de aumentada suscetibilidade a digestão por protease. Neste exemplo, as características originais da proteína (termotolerância e estabilidade ácida) precisam ser mantidas, enquanto a nova característica (aumentada suscetibilidade a uma protease) é adicionada. Pode-se também levar em consideração a atividade específica de uma enzima onde "atividade específica" de uma enzima sendo definida como a quantidade de substrato de uma enzima é capaz de converter ou catalisar durante uma dada unidade de tempo.

Há várias técnicas disponíveis para evolução de proteínas para criar variantes com características alteradas. Por exemplo, técnicas à base de alterações aleatórias de aminoácidos ou mutagênese aleatória incluem mutagênese química (Smith, Ann. Rev. Genet. 19:423-462 (1985)), DirectEvolution; (E.U. Patente Nº 5830696); Gene Site Saturação Mutagenesis (MCV) (E.U. Patente nºs 6171820 e 6579258), Seleção Final da Assembleia-Mediated Gene Exonuclease em evolução dirigida (E.U. Patente nºs 6361974 e 6352842), por evolução dirigida (E.U. Patente nºs 6358709 e 6238884), Shuffling Síntese recombinação-base (E.U. Patente nºs 5965408 e 6440668, e da Austrália Patent Nº AU724521), e direcionou a evolução de enzimas termofílicas (E.U. Patente nºs 5830696 e 6335179). Estas técnicas dão origem a um conjunto

de variantes com mutações aleatórias e este conjunto de variantes é então triado para identificar as variantes individuais com o conjunto de características desejadas.

Uma alternativa para mutagênese aleatória é o design racional no qual regiões específicas da proteína são identificados para alteração com base no que é conhecido sobre a própria proteína. Design racional incorpora o conhecimento da estrutura tridimensional, a localização do um ou mais sítios ativos e a localização do um ou mais sítios de ligação importante para prever regiões da proteína que podem ser alteradas. Com essa informação, proteínas com alterações específicas podem ser geradas e testadas para a atividade. Alterações específicas podem ser feitas individualmente ou em combinações com outras alterações para observar os efeitos combinados de diversas alterações na estrutura da proteína (Fersht, et al. *Angewandte Chemie Int. Ed.* 23:467-538 (1984)).

Design racional leva em consideração que a relação entre as características da proteína, o modelo tridimensional e o grau no qual a proteína pode ser alterada é complexa. As mutações a serem geradas na proteína são mapeadas sobre o modelo tridimensional e há consideração de sítios de ligação, sítios ativos e estrutura da proteína; esta análise se destina a aumentar a probabilidade de gerar variantes que mantenham atividade além de apresentar as novas características. Além disso, o número de variantes selecionados é relativamente baixo comparado com o número de variantes triados utilizando mutagênese aleatória.

Design racional é facilitado por um entendimento do modelo tridimensional da proteína. O modelo tridimensional pode ser elucidado por métodos os quais determinam fisicamente a estrutura tridimensional da proteína, tais como cristalografia de raios X e RMN (ressonância magnética nuclear) ou pode ser modelado computacionalmente. Métodos para resolver a estrutura de cristal da proteína fisicamente são de conhecimento geral na (Schuetz, et al. *EMBO J.* 25:4245-4252 (2006); Peterson et al. *Mol. Cell* 13:665-676 (2004); Allingham et al. *Cell* 128:1161-1172 (2007)).

Em biologia computacional, há três métodos diferentes para pre-

visão / modelagem da estrutura tridimensional de uma proteína, *ab initio*, modelagem por homologia e encadeamento de proteína. Métodos de modelagem de proteínas *ab initio*, ou de novo buscam construir modelos tridimensionais de proteínas "do zero ", isto é, com base em princípios físicos ao invés de diretamente sobre estruturas físicas previamente resolvidas. Há muitos procedimentos possíveis que ou tentam simular o dobramento de proteínas ou aplicam algum método estocástico para buscar soluções possíveis. Estes procedimentos tendem a requerer grandes recursos computacionais, e têm sido realizadas para proteínas pequenas.

Modelagem por homologia se baseia na hipótese razoável de que duas proteínas homólogas compartilharão estruturas muito similares. Como a dobra de uma proteína é mais conservada evolucionariamente do que sua sequência de aminoácidos, uma sequência-alvo pode ser modelada com razoável precisão sobre um modelo muito distantemente relacionado, contanto que a relação entre alvo e modelo possa ser discernida através de alinhamento de sequência. Foi sugerido que o gargalo primário em modelagem comparativa decorre de dificuldade no alinhamento ao invés de erros na predição da estrutura dado um bom alinhamento conhecido. Conforme esperado, a modelagem por homologia é mais precisa quando o alvo e o modelo têm sequências similares. O método de modelagem por homologia, conforme proporcionado pelo programa computacional Modeler (Accelrys Inc.), pode ser usado para modelar a estrutura tridimensional de proteína homóloga sem a necessidade de resolver a estrutura real por raios X ou RMN (Webster "Protein Structure Prediction, Methods and Protocols"; Methods in Molecular Biology; Humana Press vol 143 (2000) e Bourne and Weissig, "Structural Bioinformatics", Wiley-Liss Publisher (2003)).

O método de encadeamento de proteína encadeia a sequência de aminoácidos de uma sequência-alvo com estrutura desconhecida através de uma biblioteca de dobras de estruturas de proteínas classificadas. Em cada caso, uma função de classificação é usada para avaliar a compatibilidade da sequência com a estrutura, deste modo selecionando o melhor modelo tridimensional possível para modelagem da proteína-alvo. Este tipo de

método também é conhecido como reconhecimento de dobra 3 D-DI devido a sua análise de compatibilidade entre estruturas tridimensionais e sequências de proteínas lineares. Este método também deu origem a métodos realizando uma pesquisa de dobramento inverso avaliando a compatibilidade de
5 uma dada estrutura com um grande banco de dados de sequências, deste modo prevendo quais sequências têm o potencial de produzir uma dada dobra.

Uma vez que o modelo tridimensional da proteína é criado, este serve como o fundamento para adicionar informações adicionais conhecidas
10 sobre a proteína. É importante identificar as regiões da proteína que se sabe que são necessárias para atividade básica, tais como domínios de ligação e sítios ativos. Regiões conservadas de uma proteína podem proporcionar percepção sobre áreas da proteína que devem ser evitadas ao fazer modificações. O entendimento das estruturas físicas da proteína que são necessárias
15 para atividade ajuda a identificar áreas que podem ser modificadas. Geralmente, áreas que podem ser modificadas são aquelas que não contribuem para a formação de domínios de ligação ou sítios ativos. Além disso, áreas da proteína selecionadas para modificação não deve, interferir com domínios de ligação ou sítios ativos uma vez que tenham sido feitas alterações. Deste
20 modo, todas as alterações da proteína são mapeadas sobre o modelo tridimensional usando técnicas computacionais, tais como o programa MODELER Accelrys, de modo a determinar se a estrutura básica da proteína é mantida.

A atividade de proteínas variantes geradas ou por mutagênese aleatória ou por design racional é avaliada para selecionar variantes que sa-
25 tisfazem critérios específicos. Esses critérios específicos coincidem com as novas características desejadas na proteína. Estas novas características podem incluir, mas não estão limitadas a, atividade catalítica alterada de uma enzima, atividade em uma temperatura maior ou menor, atividade em uma faixa de temperatura larga ou estreita, atividade em um pH maior ou
30 menor, atividade em uma faixa de pH larga ou estreita, sensibilidade à degradação em um pH maior ou menor, maior suscetibilidade à digestão por uma protease, ou maior resistência à digestão por uma protease. Uma pes-

soa com conhecimento ordinário na técnica seria capaz de usar as informações reveladas neste documento e projetar e gerar uma série de variantes de uma proteína com características ou atividade de proteínas alteradas.

Técnicas de design racional têm sido empregadas para desenvolver variantes de proteínas com características específicas tais como ter-
 5 motolerância (Perry and Wetzel, Science 226:555-557 (1984); Sauer et al. Biochemistry 25:5992-5998 (1986); Volkin et al J. of Biol. Chem. 262:2945-2950(1987); Roesler et al. Protein Science 9:1642-1650 (2000)), estabilidade na presença de proteases (Wyss et al. Applied and Enviro. Micro. 65:359-
 10 366 (1999)) e estabilidade em baixo pH (Kim et al. Applied and Enviro. Micro. 72:4397-4403 (2006)). Técnicas de design racional também têm sido empregadas para desenvolver protoxinas inseticidas que, quando expostas ao intestino de um inseto, são clivadas por uma protease do intestino do inseto para liberar uma toxina inseticida (requerimento de Patente U.S. Nº 10/229.346). São des-
 15 critos aqui, neste requerimento de patente, métodos para usar técnicas de design racional para os fins de desenvolver proteínas com aumentada suscetibilidade a proteases em que a suscetibilidade leva a uma inativação da proteína.

Os seguintes fatores relacionados com a estrutura da proteína
 20 podem contribuir para aumentar a sensibilidade da proteína a proteases; o grau e localização de glicosilação, o grau de formação de pontes dissulfetos, a localização e sequência de sítios de clivagem de protease potenciais e laços de proteína os quais podem ser alterados para conter sítios de clivagem altamente favoráveis.

Glicosilação pode ter uma série de efeitos sobre as propriedades de uma enzima. Primeiro, pode ser um impacto sobre a estabilidade de uma proteína, ou pode influenciar as propriedades catalíticas. Segundo, em caso de modificação de carboidratos acidíferos, pode influenciar o pH de uma pro-
 25 teína e deste modo alterar o comportamento da proteína durante purificação. E terceiro, desviando energia metabólica, pode diminuir o nível de expressão de uma enzima. (Wyss et al. Applied and Enviro. Micro. 65:359-366 (1999)).
 30 Glicosilação de uma proteína envolve adicionar cadeias de glicano à proteí-

na as quais podem interferir fisicamente com a capacidade de uma protease para fazer contato com um sítio de ligação (Bagger et al. Biochemistry 42:10295-10300 (2003)). A diminuição da glicosilação de uma proteína pode aumentar a sensibilidade para uma protease, abrindo a estrutura da proteína para permitir interação da protease com sítios de ligação potenciais.

Estruturas de proteínas altamente estáveis (ou dobramento de proteínas) podem evitar desdobramento suficiente das proteínas para permitir que uma protease acesse sítios de clivagem potenciais que estão dentro da estrutura tridimensional da proteína. Pontes de dissulfeto contribuem para a estabilidade de uma estrutura de formando pontes entre resíduos cisteína que entram em proximidade física entre si outros quando a proteína está dobrando. Estes resíduos cisteína não estão necessariamente próximos uns dos outros ao examinar a sequência de aminoácidos lineares da proteína. Vide Stryer, Bioquímica 4^a ed., WH Freeman and Co, em Nova Iorque (1995). A substituição de resíduos cisteína específicos pode diminuir a extensão de pontes dissulfeto intramoleculares que podem desestabilizar uma proteína o suficiente para permitir que uma protease acesse um sítio de clivagem que é interno à proteína dobrada.

A incorporação de sítios de clivagem de protease pode aumentar a sensibilidade a uma protease. Sequências de proteínas nativas que são similares a um sítio de clivagem de protease de alta afinidade podem ser alteradas para refletir um sítio altamente favorável. Este tipo de modificação para a sequência de proteína representa uma modificação menor para a proteína. Alternativamente, sítios de clivagem de protease altamente favoráveis podem ser introduzidos na proteína de novo, o que representa uma modificação importante para a proteína. Em ambos os casos, a alteração maior ou menor para a proteína, o modelo tridimensional é usado para identificar regiões da proteína dobrada que são candidatas para a modificação referida. Em particular, laços de proteínas que estão expostos ao meio circundante são candidatos a alteração. Além disso, esses laços não devem interferir com sítios de ligação ou sítios ativos na proteína.

Acredita-se de modo geral que a estabilidade estrutural de uma

proteína está relacionada com a capacidade da proteína para resistir a condições extremas, tais como temperatura e pH. Características estruturais tais como glicosilação e formação de pontes dissulfeto contribuem para a estabilidade de uma proteína e também podem contribuir para aumentar a capacidade de proteínas para resistir a condições extremas de temperatura e pH. Estas mesmas características estruturais, isto é, glicosilação e formação de pontes dissulfeto, são direcionados para produzir suscetibilidade enzimática. O desacoplamento de atividade em condições extremas de características que aumentaram a estabilidade da proteína dobrada é um desafio para a engenharia de proteínas enzimaticamente suscetíveis.

As considerações acima descritas para produzir proteínas com aumentada suscetibilidade a proteases levam à formulação de uma variedade de mutações que afetam glicosilação, formação de pontes dissulfeto, e criação de sítios de clivagem de protease altamente favoráveis. As alterações previstas na sequência de proteínas podem ser geradas como alterações únicas ou em várias combinações (Roesler et al. Protein Science 9:1642 - 1650 (2000)). Por exemplo, pode ser que se veja que existem sítios de glicosilação múltiplos sobre uma proteína em particular. Estes sítios podem ser alterados um de cada vez ou podem ser todos alterados uma única variante. Como outro exemplo, um sítio de glicosilação e a alteração de uma ligação dissulfeto podem ser combinados em uma única variante. Em essência, as variações identificadas através de análise do modelo tridimensional podem ser consideradas módulos que podem ser combinados à vontade para gerar variantes para experimentação.

Os termos domínio e sítio quando se referem a uma proteína são usados de modo intercambiável e podem se referir a sequências de aminoácidos lineares identificadas dentro de uma proteína ou podem se referir a áreas estruturais que existem quando a proteína está em um estado dobrado.

Uma modalidade da invenção é um método de aumentar a suscetibilidade enzimática por meio de técnicas de design racional em que a estrutura tridimensional de uma proteína é modelada e identificação de ca-

racterísticas subsequentes da proteína selecionadas entre o grupo consistindo em sítios de ligação, sítios ativos, sítios de glicosilação, ligações de dissulfeto, e laços de proteína expostos ao meio circundante.

5 Outra modalidade da invenção é um método de aumentar a suscetibilidade enzimática por meio de técnicas de design racional em que a proteína-alvo é primeiro processada para ter uma estrutura tridimensional mais estável. A estabilidade pode ser aumentada através de design racional ou técnicas de mutagênese aleatória. A estabilidade pode ser medida pela capacidade da proteína para funcionar sob condições de temperatura superior (estabilidade termodinâmica) ou condições de pH extremo. A estabilidade pode assumir muitas formas, tais como pontes dissulfeto as quais estabilizam as intramoleculares, além de alterações para estruturas de dobramento que compõem uma estrutura tridimensional mais compacta (estabilidade conformacional). Técnicas para engenharia de termoestabilidade em uma
10 proteína são conhecidas na arte tais como Nosoh et al. Tibtech Voi 8: 16-20 (1990) e Imanaka et al. Nature 324:695-697 vol (1986).

Estabilidade termodinâmica é definida em termos de temperatura e atividade e é determinada comparando a atividade da variante com a proteína de partida. A temperatura máxima da proteína é determinada mantendo a proteína em uma temperatura especificada e em seguida medindo a
20 atividade da proteína. A temperatura máxima é definida como a temperatura na qual a proteína mantém cerca de 50% de atividade depois de ter sido mantida por 5 minutos em uma temperatura específica. Uma variante termoestável é aquela na qual a variante apresenta no mínimo 50% de atividade de quando mantida por 5 minutos em uma temperatura que está 5 graus C
25 acima da temperatura máxima da proteína. Por exemplo, se a proteína de partida conserva 50% de atividade quando mantida por 5 minutos a 45 graus C, então as variantes termoestáveis seriam todas as variantes que reteriam no mínimo 50% de atividade quando mantidas a 50 graus C por 5 minutos.

30 Qualquer proteína pode ser processada para ser mais enzimaticamente suscetível com base na descrição acima. Proteínas que têm uma função em um processo industrial servem como bons candidatos para enge-

nharia orientada porque já podem ser conhecidas características estruturais e funcionais da proteína. A informação estrutural e funcional serve como uma base para modificar adicionalmente a proteína para ser enzimaticamente suscetível. Existe uma variedade de proteínas com importância para processos industriais incluindo: enzimas ou proteínas que contribuem para uma característica de valor agregado, proteínas que conferem resistência a doenças ou pragas em plantas transgênicas, proteínas ou enzimas que conferem tolerância a herbicida à planta transgênica.

Exemplos de genes que conferem ou contribuem para uma característica de valor agregado incluem, mas não estão limitados a, uma enzima fitase a qual quebra o fitato, um elemento não-nutritivo em rações animais à base de cereais. Por exemplo, vide Van Hartingsveldt et al. Gene 127: 87 (1993), para a descrição da sequência de nucleotídeos de um gene de fitase de *Aspergillus niger*. Pode ser introduzido um gene que reduz o teor de fitato. Em milho, isto poderia ser realizado, por exemplo, por clonagem e, em seguida, reintroduzindo DNA associado com o único alelo o qual é responsável por mutantes de milho caracterizados por baixos níveis de ácido fítico. Vide Raboy et al., Maydica 35: 383 (1990). Composição de carboidratos modificada efetuada, por exemplo, transformando plantas com um gene codificando para uma enzima que altera o padrão de ramificação de amido. Vide Shiroza et al., J. Bacteriol. 170: 810 (1988) (sequência de nucleotídeos de gene fructosiltransferase de *Streptococcus mutans*), Steinmetz et al., Mol Gen. Genet. 200: 220 (1985) (sequência de nucleotídeos de gene levansucrase de *Bacillus subtilis*), Pen et al., Bio/Technology 10: 292 (1992) (produção de plantas transgênicas que expressam α -amilase de *Bacillus licheniformis*), Elliot et al., Plant Molec. Biol. 21: 515 (1993) (sequências de nucleotídeos de genes invertase de tomate), S.o-gaard et al., J. Biol. Chem. 268: 22480 (1993) (mutagênese sítio-dirigida de cevada (gene de α -amilase), and Fisher et al., Plant Physiol. 102: 1045 (1993) (enzima II de ramificação de amido do endosperma do milho). Proteínas que alteram o aroma de alimentos tais como a proteína brrazein.

Genes que conferem resistência a pragas e doença também po-

dem ser processados para serem enzimaticamente suscetíveis. As defesas vegetais são frequentemente ativadas por interação específica entre o produto de um gene de resistência a doenças na planta e o produto de um gene de avirulência correspondente no patógeno. Uma planta pode ser transformada com gene de resistência clonado para projetar plantas que são resistentes a cepas de patógenos específicos. Vide, por exemplo, Jones et al., Science 266: 789 (1994) (clonagem do gene Cf-9 de tomate para resistência a *Cladosporium fulvum*); Martin et al., Science 262: 1432 (1993) (gene Pto de tomate para resistência a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* codifica uma proteína quinase); Mindrinos et al. Cell 78:1089 (1994) (gene RSP2 de *Arabidopsis* para resistência a *Pseudomonas syringae*). Uma proteína de *Bacillus thuringiensis*, um derivado da mesma ou um polipeptídeo sintético modelado sobre a mesma. Vide, por exemplo, Geiser et al., Gene 48: 109 (1986), que revelam a clonagem e sequência de nucleotídeos de um gene de Bt delta-endotoxina. Além disso, moléculas de DNA codificando genes de delta-endotoxina podem ser adquiridas da American Type Culture Collection (Rockville, Md.), por exemplo, sob os N^{os} de Acesso ATCC 40098, 67136, 31995 e 31998. Existem muitos exemplos de proteínas de *Bacillus thuringiensis* incluindo mas não limitados a Cry IA, CryIB, Cry3A, Cry4A, e Cry9C.

Uma lecitina conforme descrito por Van Damme et al., Plant Molec. Biol. 24: 25 (1994), que revelam as sequências de nucleotídeos de vários genes de lecitina de ligação de manose de *Clivia miniata*. Uma proteína de ligação de vitamina tal como avidina, conforme descrito no requerimento de Patente U.S. PCT US93/06487, ensina o uso de avidina e homólogos de avidina como larvicidas contra pragas de insetos. Um inibidor enzimático, por exemplo, um inibidor de protease ou um inibidor de amilase, por exemplo, Abe et al., J. Biol. Chem. 262: 16793 (1987) (sequência de nucleotídeos de inibidor de proteinase cisteína do arroz), Huub et al., Plant Molec. Biol. 21: 985 (1993) (sequência de nucleotídeos de cDNA codificando inibidor da proteinase do tabaco I), e Sumitani et al., Biosci. Biotech. Biochem. 57: 1243 (1993) (sequência de nucleotídeos de *Streptomyces nitrosporeus* (inibidor de α -amilase). Um peptídeo inseto-específico ou neuropeptídeo o qual, na expressão,

prejudica a afisiologia da praga afetada. Por exemplo, vide as revelações de Regan, J. Biol. Chem. 269: 9 (1994) (clonagem de expressão produz DNA codificando para receptor do hormônio diurético de insetos), e Pratt et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 163: 1243 (1989) (uma alostatina é identificada em *Diploptera punctata*). Vide também a Patente U.S. Nº 5.266.317 a qual revela genes codificando neurotoxinas paralíticas inseto-específicas. Um veneno inseto-específico produzido na natureza por uma cobra, uma vespa, e etc. Por exemplo, vide Pang et al., Gene 116: 165 (1992), para descrição de expressão heteróloga em plantas de um gene codificando para um peptídeo inseto tóxico de escorpião. Uma enzima envolvida na modificação, incluindo a modificação pós-translacional, de uma molécula biologicamente ativa; por exemplo, uma enzima glicolítica, uma enzima proteolítica, uma enzima lipolítica, uma nuclease, uma ciclase, uma transaminase, uma esterase, uma hidrolase, uma fosfatase, uma quinase, uma fosforilase, uma polimerase, uma elastase, uma quitinase e uma glucanase, quer natural ou sintética. Vide o requerimento de patente internacional PCT Nº WO 93/02197 no nome de Scott et al., o qual revela a sequência de nucleotídeos de um gene callase. Moléculas de DNA as quais contêm sequências codificando quitinase podem ser obtidas, por exemplo, da ATCC sob os Nos. de Acesso 39637 e 67152. Vide também Kramer et al., Insect Biochem. Molec. Biol. 23: 691 (1993), que ensinam a sequência de nucleotídeos de um cDNA codificando quitinase do ancilóstomo do tabaco, e Kawalleck et al., Plant Molec. Biol. 21: 673 (1993), que proporcionam a sequência de nucleotídeos do gene *ubi4-2* poliubiquitina de salsa. Uma molécula que estimula transdução de sinal. Por exemplo, vide a descoberta por Botella et al., Plant Molec. Biol. 24: 757 (1994), de sequências de nucleotídeos para clones de cDNA de calmodulina de feijão mung bean, e Griess et al., Plant Physiol. 104: 1467 (1994), que proporcionam a sequência de nucleotídeos de um clone de cDNA de calmodulina. Uma membrana permease, um formador de canal ou um bloqueador de canal, por exemplo, vide a descoberta de Jaynes et al., Plant Sci. 89: 43 (1993), de expressão heteróloga de um análogo do peptídeo cecropin-beta-lítico para tornar plantas de tabaco transgênicas resistentes.

tes a *Pseudomonas solanacearum*. Uma proteína viral-invasiva ou uma toxina complexa derivada da mesma. Por exemplo, a acumulação de proteínas de capa viral em células de plantas transformadas confere resistência à infecção viral e/ou desenvolvimento de doença efetuada pelo vírus do qual o gene de proteína da capa é derivado, bem como por vírus relacionados. Vide Beachy et al., Ann. Rev. Phytopathol. 28:451 (1990). Resistência mediada por proteína da capa foi conferida a plantas transformadas contra vírus do mosaico da alfafa, vírus do mosaico do pepino, vírus da risca do tabaco, vírus X da batata, vírus Y da batata, vírus ETV do tabaco (*tobacco etch virus*), vírus RTV do tabaco (*tobacco rattle virus*), e vírus do mosaico do tabaco. Um anticorpo inseto-específico ou uma imunotoxina derivada do mesmo. Portanto, um anticorpo direcionado para uma função metabólica crucial no intestino do inseto inativaria uma enzima afetada, matando o inseto. Cf. Taylor et al., Abstract No. 497, Seventh Int'l Symposium On Molecular Plant-Microbe Interactions (Edinburgh, Escócia, 1994) (inativação enzimática em tabaco transgênico através da produção de fragmentos de anticorpos de cadeia única). Um anticorpo vírus-específico. Vide, por exemplo, Tavladoraki et al., Nature 366:469 (1993), que demonstram que plantas transgênicas expressando genes de anticorpos recombinantes são protegidos contra ataque por vírus.

Uma proteína de parada do desenvolvimento produzida na natureza por um patógeno ou um parasita. Portanto, endo alfa- 1,4-D-poligalacturonases fúngicas facilitam colonização fúngica e liberação de nutrientes pela planta por solubilização homo- alfa- 1,4-D-galacturonase da parede celular vegetal. Vide Lamb et al., Bio/Technology 10: 1436 (1992). A clonagem e caracterização de um gene o qual codifica uma proteína de inibição de endopoligalacturonase do feijão é descrita por Toubart et al., Plant J. 2: 367 (1992). Uma proteína de parada do desenvolvimento produzida na natureza por uma planta. Por exemplo, Logemann et al., Bio/Technology 10: 305 (1992), demonstraram que plantas transgênicas expressando o gene inativador do ribossomo da cevada têm uma resistência aumentada a doença fúngica.

Genes que conferem resistência a um herbicida, por exemplo, também podem ser processados para serem enzimaticamente suscetíveis.

Por exemplo, proteínas que mediam tolerância a um herbicida que inibe o ponto de crescimento ou meristema, tal como uma imidazalinona ou uma sulfonilureia. Genes exemplares nesta categoria codificam para enzima mutante ALS e AHAS conforme descrito, por exemplo, por Lee et al. EMBO J. 7: 1241 (1988), e Miki et al. Theor. Appl. Genet. 80: 449 (1990), respectivamente. Glifosato (resistência conferida por genes 5-enolpiruvil-3-fosfiquimato sintase mutante (EPSP) e Aroa, respectivamente) e outros compostos fosforais tais como genes de glufosinato (fosfinotricina acetil transferase (PAT) e fosfinotricina acetil transferase (bar) de *Streptomyces hygroscopicus*), e piridinóxi ou os ácidos fenóxi propriônicos e ciclohexonas (genes codificando inibidor da ACCase). Vide, por exemplo, a Patente U.S. Nº 4.940.835, a qual revela a sequência de nucleotídeos de uma forma de EPSP a qual pode conferir resistência a glifosato. Uma molécula de DNA codificando um gene Aroa mutante pode ser obtida sob ATCC acesso No. 39.256, e a sequência de nucleotídeos do gene mutante é revelada na Patente U.S. Nº 4.769.061 e o requerimento de patente europeia Nº 0 333 033 e a Patente U.S. Nº 4.975.374 revelam sequências de nucleotídeos de genes de glutamina sintetase as quais conferem resistência a herbicidas tais como L-fosfinotricina. A sequência de nucleotídeos de um gene de fosfinotricina-acetil-transferase é proporcionada no requerimento de patente europeia Nº 0 242 246. De Greef et al. Bio / Technology 7: 61 (1989), descrevem a produção de plantas transgênicas que expressam genes bar quiméricos codificando para atividade de fosfinotricina acetil transferase. Exemplos de genes conferindo resistência a ácidos fenóxi propriônicos e ciclohexonas, tais como setoxidima e haloxifop, são os genes ACCL-SL, ACCL-S2 e ACCL-S3 descritos por Marshall et al. Theor. Appl. Genet. 83: 435 (1992). Um herbicida que inibe fotossíntese, tal como uma triazina (genes psbA e gs+) e uma benzonitrila (gene nitrilase). Przibilla et al. Plant Cell 3: 169 (1991) descrevem a transformação de *Chlamydomonas* com plasmídeos codificando genes psbA mutantes. Sequências de nucleotídeos para genes de nitrilase são revelados na Patente U.S. Nº 4.810.648, e moléculas de DNA contendo estes genes estão disponíveis sob N^{os} de Acesso ATCC 53435, 67441 e 67442. Clonagem e expres-

são de DNA codificando para uma glutathione S-transferase é descrita por Hayes et al. *Biochem J.* 285: 173 (1992).

Suscetibilidade enzimática pode ser processada para produzir uma proteína suscetível a qualquer protease. Proteases são enzimas que hidrolisam ligações de peptídeos (Barrett, et al. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press, San Diego, San Francisco, New York, Boston, Londres, Sydney, Tóquio (1998)). Proteases podem ser referidas como peptidases e geralmente estão dentro de uma das classes de peptidases de serina, peptidases de cisteína, peptidases aspárticas e metalopeptidases. Proteases específicas incluem, mas não estão limitadas à pepsina, tripsina, quimiotripsina, endopeptidase pancreática, cathepsina G, quimase, triptase, papaína, elastase, carboxipeptidase, quimopapaína, caspase-1, e dipeptidase E. Uma lista extensiva de proteases pode ser encontrada no *Handbook of Proteolytic Enzymes* referido acima.

Outra modalidade da invenção é um cassete de expressão em que uma proteína enzimaticamente suscetível é ligada operavelmente a no mínimo uma sequência regulatória, tal como um promotor, um intensificador, um íntron, uma sequência de terminação, ou qualquer combinação dos mesmos, e, opcionalmente, a uma sequência sinal, a qual direciona a proteína enzimaticamente suscetível a uma localização celular determinada, por exemplo, vacúolo, aleurona, embrião ou retículo endoplasmático. Os cassetes de expressão também podem incluir quaisquer sequências adicionais necessárias ou selecionadas para a expressão da proteína enzimaticamente suscetível. As sequências referidas incluem, mas não estão limitadas a, terminadores de transcrição, sequências estranhas para reforçar a expressão tais como íntrons, sequências virais, e sequências destinadas ao direcionamento do produto genético para organelas e compartimentos celulares específicos. Operavelmente, ligada se refere a unido como parte da mesma molécula de ácido nucleico, adequadamente posicionada e orientada. No caso de sequência regulatória, orientação da sequência regulatória (isto é, sentido ou antissenso) pode não afetar a capacidade da sequência regulatória para afetar transcrição.

Exemplos típicos de promotores incluem, mas não estão limitados a, promotores conhecidos para controlar expressão de genes em células procarióticas ou eucarióticas ou seus vírus. Células procarióticas são definidas como células que não têm um núcleo e se destinam a incluir a classe recentemente identificada de arqueobactérias. Em uma modalidade, o cassete de expressão compreende um promotor bacteriano. Exemplos de promotores bacterianos incluem, mas não estão limitados a lac ou trp de *E. coli*, o promotor do fago lâmbda Pt, lad, lacZ, T3, T7, gpt, e lâmbda P*. Promotores eucarióticos incluem, mas não estão limitados a CMV imediato precoce, timidina quinase de HSV, SV40 precoce e tardio, LTRs de retrovírus, e metalotioneína-I de camundongo. Promotores procarióticos e eucarióticos são descritos de modo geral em Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989), Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, (1987); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990).

Outra modalidade da invenção é um cassete de expressão em que uma proteína enzimaticamente suscetível é ligada operavelmente a um promotor capaz de expressão em uma célula de levedura. Qualquer promotor capaz de expressão em hospedeiros de levedura pode ser usado como o promotor. Exemplos incluem promotores para genes de hexoquinase e semelhantes no caminho glicolítico, e promotores tais como promotor gal 1, promotor gal 10, promotor da proteína de choque térmico, promotor MFa-1 e promotor CUP 1. Exemplos de promotores de levedura podem ser encontrados em MacPherson et al, *Micro e Molec. Bio. Revs.* 70:583-604 (2006).

Outra modalidade da invenção é um cassete de expressão em que uma proteína enzimaticamente suscetível é ligada operavelmente a um promotor capaz de expressão em fungos filamentosos. Pode ser usado qualquer promotor capaz de expressão em fungos filamentosos. Exemplos são um promotor para glicoamilase ou alfa-amilase para o gênero *Aspergillus* (DeVries et al. *Micro e Molec. Bio. Revs.* 65:497-522 (2001)) ou celulase (celobiohidrase) do gênero *Trichoderma*, um promotor para enzimas no caminho glicolítico, tal como fosfoglicerato quinase (PGK) e glicerilaldeído 3-

fosfato desidrogenase (GPD), e etc Exemplos de promotores caracterizados em fungos filamentosos podem ser encontrados em Lorang et al. Appl. e Enviro. Micro. 67:1987-1994 (2001).

Outra modalidade da invenção é um cassete de expressão em
5 que uma proteína enzimaticamente suscetível é ligada operavelmente a um promotor capaz de expressão em plantas. Seleção do promotor a ser usado em cassetes de expressão determinará o padrão de expressão temporal e espacial da proteína enzimaticamente suscetível na planta transgênica. Promotores selecionados irão expressar transgenes em tipos celulares pre-
10 ferenciais (tais como células epidérmicas de folhas, células do mesófilo, células do córtex da raiz) ou em tecidos ou órgãos preferenciais (raízes, folhas ou flores, por exemplo) ou em estágios preferenciais de desenvolvimento da planta (desenvolvimento de flor, desenvolvimento foliar ou estágio de crescimento da planta, por exemplo) e a seleção deve refletir a localização dese-
15 jada de acumulação do produto genético. Alternativamente, o promotor selecionado pode dirigir a expressão do gene sob várias condições de indução. Promotores variam em sua força, isto é, capacidade para promover transcrição. Dependendo do sistema celular hospedeiro utilizado, pode ser usado qualquer um de uma série de promotores adequados, incluindo o promotor
20 natural do gene. Promotores os quais são úteis para expressão do transgene vegetal incluem os que são indutíveis, virais, sintéticos, constitutivos, regulados temporalmente, regulados espacialmente, tecido-específicos, e regulados espaço-temporalmente.

Uma modalidade da invenção é um cassete de expressão em
25 que a proteína enzimaticamente suscetível é ligada operavelmente a um promotor constitutivo capaz de expressão em plantas. Exemplos de alguns promotores constitutivos os quais foram descritos incluem a actina 1 do arroz (Wang et al. Moi. Cell. Biol., 12:3399 (1992); Patente U.S. Nº 5.641.876; McElroy et al. Plant Cell 2: 163 - 171 (1990)). CaMV 35S (Odell et al. Nature
30 313:810 (1985)), CaMV 19S (Lawton et al. Moi. Cell. Biol. 7:335 (1987)), sacarose sintase, e os promotores de ubiquitina (Binet et al. Fitotecnica 79: 87-94 (1991), Christensen et al. Molec Plant. Biol. 12: 619-632 (1989), Norris et

al. *Plant Mol. Biol.* 21. :895-906 (1993)).

Uma modalidade da invenção é um cassete de expressão em que a proteína enzimaticamente suscetível é ligada operavelmente a um promotor de planta indutível. Promotores indutíveis que foram descritos incluem os promotores induzíveis por ABA e turgor, o promotor do gene da proteína de ligação de auxina (Schwob et al. *Plant* 4:423 J. (1993)), o promotor do gene UDP glicose flavonoide glicosil -transferase (Ralston et al. *Genetics*, 119:185 (1988)), o promotor inibidor da protease MPI (Cordero et al. *Plant* 6:141 J. (1994)), e o promotor do gene gliceraldeído-3-fosfato deidrogenase (Kohler et al. *Plant Mo Biol.* 29:1293 (1995); Quigley et al. *J. Mol. Evol.* 29:412 (1989), Martinez et al. *J. Mol. Biol.* 208:551 (1989)), o promotor PR-la o qual é quimicamente indutível é descrito na Patente U.S. Nº 5.614.395, o promotor PR-la também é indutível por fermento (Lebel al al. *Plant J.* 16:223-233 (1998)). Vários reguladores químicos podem ser empregados para induzir expressão da sequência de polinucleotídeos selecionada em plantas transgênicas, incluindo os compostos benzotriazol, ácido isonicotínico e ácido salicílico revelados nas Patentes U.S. Nºs 5.523.311 e 5.614.395. Um promotor semelhante é, por exemplo, o promotor do gene *alcA* de *Aspergillus nidulans* (Caddick et al. *Nat. Biotechnol* 16:177-180 (1998)). Em *A. nidulans*, o gene *alcA* codifica desidrogenase alcoólica I, cuja expressão é regulada pelos fatores de transcrição *AlcR* na presença do indutor químico. O sistema de indução mediado por glicocorticoide também pode ser usado (Aoyama and Chua (1997) *The Plant Journal* 11: 605-612) Promotores indutíveis por fermento também podem ser adequados para expressão genética. Têm sido descritos numerosos promotores semelhantes (por exemplo, Xu et al. *Plant Molec. Biol.* 22: 573-588 (1993), Logemann et al. *Plant Cell* 1: 151-158 (1989), Rohrmeier & Lehle, *Plant Molec. Biol.* 22: 783-792 (1993), Firek et al. *Plant Molec. Biol.* 22:129-142 (1993), Warner et al. *Plant J.* 3: 191-201 (1993)). Vários promotores indutíveis são conhecidos na técnica. Muitos são descritos em uma revisão por Gatz, *Current Opinion in Biotechnology* 7:168 (1996) (vide também Gatz, *Annual Rev. Plant Physiol.* *Plant Mol. Biol.* 48:89 1997). Exemplos incluem o sistema repressor de tetra-

ciclina, sistema repressor Lac, sistemas indutíveis por cobre, sistemas indutíveis por salicilato (tais como o sistema PRLa), sistemas indutíveis por glicocorticoide (Aoyama T. et al., N-H Plant Journal, 11:605 (1997)) e indutíveis por ecdisona (requerimento de patente internacional No. WO 01/52620).

- 5 Também são incluídos os sistemas indutíveis por benzeno sulfonamida (Patente U.S. Nº 5.364.780) e indutíveis por álcool (patente internacional Nº WO 97/06269, patente internacional Nº WO 97/06268 e patente internacional Nº WO 02/061102) e promotores de glutathione S-transferase e o hormônio de inseto quimérico e sistema receptor descrito na patente internacional Nº WO
- 10 02/061102.

Uma modalidade da invenção é um cassete de expressão em que a proteína enzimaticamente suscetível é ligada operavelmente a um promotor tecido-preferencial capaz de expressão em plantas. Exemplos de promotores tecido-preferenciais os quais foram descritos incluem, mas não são

15 tão limitados à lecitina (Vodkin, Prog. GHN. Bio. Res., 138:87 (1983); Lindstrom et al. Der. Genet (1990)), álcool desidrogenase 1 do milho (Vogel et al. EMBO J., 11:157 (1989), Dennis et al. Nucleic Acids Res., 12:3983 (1984)), complexo de colheita leve de milho (Simpson, Plant Mo. Bio., 19:699 (1986); Bansal et al., Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A., 89: 3654 (1992)), proteína do

20 choque térmico do milho (Odell et al. Nature, 313: 810 (1985)), pequena subunidade RuBP carboxilase da ervilha (Poulsen et al. Mol. Gen. Genet. 205: 193 (1986)), Ti plasmídeo manopina-sintase (Langridge et al. 34:1015 Cell (1989)), Ti plasmídeo da nopalina- (Langridge et al. 34:1015 Cell (1989)), calcona isomerase da petunia (vanTunen et al. EMBO 7:1257 J. (1988)), pro-

25 teína 1 rica em glicina do feijão (Keller et al. EMBO J. 8 : 1309 (1989)), CaMV 35S truncada (Odell et al. 313:810 Nature (1985)), patatina da batata (Wenzler et al. Plant Mol. Biol. 13:347 (1989)), célula da raiz (Yamamoto et al. Nucleic Acids Res. 18:7449 (1990)), zeína do milho (Reina et al., Nucleic Acids Res. 18:7449 (1990); Kriz et al., Mol. Gen. Genet 207:90 (1987));

30 Wandelt et al., Nucleic Acids Res. 17:2354 (1989); Langridge et al., Cell 34:1015 (1983); Reina et al., Nucleic Acids Res. 18:7449 (1990)), globulina-1 (Belanger et al., Genetics 129:863 (1991)), alfa-tubulina, cab (Sullivan et al.,

Mol. Gen. Genet. 215:431 (1989)), PEPCase (Hudspeth et al., Plant Mo. Bio., 12:579 (1989)), promotores associados ao complexo genético R (Chandler et al., Plant Cell 1:1175 (1989)), e promotores de calcona sintase (Franken et al., EMBO J. 10:2605 (1991)). Estes incluem, por exemplo, o promotor rbcS, preferencial para tecido verde; os promotores ocs, nos e mas os quais têm maior atividade em raízes ou tecido foliar ferido; um promotor 35S truncado (-90 a +8) o qual direciona aumento de expressão em raízes, um gene de alfa-tubulina que dirige a expressão em raízes e promotores derivadas de genes de proteína de armazenamento de zeína os quais dirigem a expressão no endosperma.

Em uma modalidade, o promotor é um promotor de endosperma preferencial tal como um promotor de gama-zeína glutelina-2 do milho, ou o promotor de gama-zeína glutelina-2 de 27 KD do milho (Woo et al. The Plant Cell 13:2297-2317 (2001)) ou um promotor de ADP-glicose pirofosforilase do milho (Brangeon, et al. Plant Physiol. Biochem. 35:847-858 (1997)). O promotor pode ser um promotor de embriões específicos, tal como promotor de globulina 1 do milho ou de oleosina de 18 KD do milho (Qu et al. J. de Biol. Chem. 265:2238-2243 (1990)).

No caso de um organismo multicelular, o promotor também pode ser específico para um tecido, órgão ou estágio de desenvolvimento de particular. Exemplos de semelhantes promotores incluem, mas não estão limitados a, o promotor de Zea mays ADP gpp (Greene et al. Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 95:13342-13347 (1998)) e o promotor de Zea mays gama-zeína (Woo et al. The Plant Cell 13:2297-2317 (2001)).

Têm sido reportados vários genes e/ou promotores regulados tecidos-específicos em plantas. Estes incluem, mas não estão limitados a genes codificando as proteínas de armazenamento de sementes (tais como napina, cruciferina, beta-conglicinina e faseolina) proteínas de corpos oleosos ou zeína ou (tais como oleosina), ou genes envolvidos na biossíntese de ácidos graxos (incluindo proteína de veículo de acila, estearoil-ACP dessaturase. E dessaturases de ácidos graxos (fad 2-1)), e outros genes expressados durante o desenvolvimento do embrião (tais como Bce4, vide, por

exemplo, a patente europeia Nº EP 255378 e Kridl et al. Seed Science Research 1:209 (1991)). Também é útil para expressão semente-específica o promotor de vicilina da ervilha (Czako et al. Mol. Gen. Genet., 235:33 (1992); Vide também a Patente U.S. Nº 5.625.136)). Outros promotores úteis para

5 expressão em folhas maduras são aqueles que estão ligados no início da senescência, tais como o promotor SAG de Arabidopsis (Gan et al. Science 270: 1986 (1995)). Promotores de raiz preferenciais incluem o promotor do gene semelhante à metalotioneína do milho (MTL) descrito por de Framond (FEBS 290: 103-106 (1991)) e também na Patente U.S. Nº 5.466.785. O re-

10 querimento de patente internacional Nº WO 93/07278 descreve o isolamento do gene trpA do milho, o qual é preferencialmente expressado em células da medula das plantas. Um gene de milho codificando fosfoenol carboxilase (PEPC) foi descrito por Hudspeth et al. (Plant Biol Molec 12: 579-589 (1989)). Usando as técnicas biológicas moleculares de rotina o promotor para este

15 gene pode ser usado para orientar a expressão de qualquer gene em uma maneira específica para folhas em plantas transgênicas. O WO requerimento de patente internacional Nº 93/07278 descreve o isolamento do gene de proteína quinase cálcio-dependente do milho (CDPK) o qual é expressado em células do pólen.

20 Uma classe dos promotores específicos de frutas expressados em ou durante a antese, através do desenvolvimento dos frutos, no mínimo até o início da maturação, é discutida na Patente U.S. Nº 4.943.674. Foram isolados clones de cDNA que são preferencialmente expressados em fibras de algodão (John et al. Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 89:5769 (1992)). Clones

25 de cDNA de tomate apresentando expressão diferencial durante o desenvolvimento do fruto foram isoladas e caracterizados (Mansson et al. Gen. Genet, 200:356 (1985), Slater et al. Plant Mol. Biol. 5:137 (1985)). O promotor para o gene da poligalacturonase está ativo no amadurecimento dos frutos. O gene da poligalacturonase é descrito na Patente U.S. Nº 4.535.060, na Pa-

30 tente U.S. Nº 4.769.061, na Patente U.S. Nº 4.801.590, e na Patente U.S. Nº 5.107.065 e o promotor da poligalacturonase do tomate de maturação reforçada é descrito por Bird et al. em Plant Molecular Biology 11 : 651 (1988).

Outros exemplos de promotores tecido-específicos incluem aqueles que orientam expressão direta em células de folhas depois de dano à folha (por exemplo, por insetos mastigadores), em tubérculos (por exemplo, o promotor do gene patatina), e em células de fibras (um exemplo de uma

5 proteína celular de fibra regulada pelo desenvolvimento é E6 (John et al. Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 89:5769 (1992)). O gene E6 é o mais ativo em fibra, embora sejam encontrados baixos níveis de transcritos em folhas, nos óvulos e em flores.

A tecido-especificidade de alguns promotores "tecido-específicos" ou "tecido preferenciais" pode não ser absoluta e pode ser testada por uma

10 pessoa versada na técnica usando a sequência da toxina diftérica. Pode-se também obter expressão tecido-preferencial com expressão vazada por uma combinação de diferentes promotores tecido-específicos (Beals et al. Plant Cell 9:1527 (1997)). Outros promotores tecido preferenciais podem ser iso-

15 lados por uma pessoa versada na técnica (vide a Patente U.S. Nº 5.589.379). Promotores tecido-específico ou tecidos-preferenciais não se destinam a ser construídos como promotores que são expressados apenas em um tecido específico. Tecido-específicos ou tecido-preferenciais se refere a promotores que favorecem um tecido em particular para expressão, mas este favoreci-

20 mento de um tipo de tecido não é sempre absoluto.

Outra modalidade da invenção é um cassete de expressão compreendendo uma proteína enzimaticamente suscetível ligada operativamente a uma sequência de direcionamento. Uma sequência de direcionamento é qualquer sequência a qual direciona o transcrito de um produto genético es-

25 pecífico no interior das células de uma planta transgênica ou direciona uma proteína para ambiente intracelular ou extracelular particular. Os termos sequência de direcionamento, sequência de classificação e sequência de sinal são intercambiáveis. Sequências de direcionamento compreende peptídeos de trânsito ou peptídeos de sinal ou sequências de retenção as quais podem

30 ser sequências de peptídeos separados ou podem ser usadas em combinações quer unidas entre si ou quer unidas à proteína enzimaticamente suscetível isoladamente ou em múltiplos.

Direcionamento geralmente será obtido unindo uma sequência de DNA codificando uma sequência de trânsito à sequência de polinucleotídeos de um gene em particular. A sequência de trânsito pode ser unida ou no término amino (N-terminal) da fitase enzimaticamente suscetível, ou no
5 término carbóxi (C-terminal) da fitase enzimaticamente suscetível. O peptídeo de trânsito resultante transportará a proteína para uma destinação intracelular ou extracelular em particular, respectivamente, e pode ser então removido pós-translacionalmente. Peptídeos de trânsito atuam facilitando o transporte de proteínas através de membranas intracelularmente, por exemplo, membranas de vacúolo, de vesícula, de plastídeo e mitocondriais, ou
10 proteínas diretas através da membrana extracelular.

Em plantas, a sequência de sinais pode direcionar o polipeptídeo codificado pelo polinucleotídeo para um compartimento específico no interior de uma planta. Exemplos de semelhantes alvos incluem, mas não estão limi-
15 tados a, um vacúolo, amiloplastos, retículo endoplasmático, cloroplasto, apoplasto ou grânulo de amido. Um exemplo de uma sequência de sinal inclui a sequência de sinal de N-terminal da gama-zeína do milho para direcionamento para o retículo endoplasmático e secreção no apoplasto (Torrent et al. *Plant Mol. Biol.* 34:139 (1997)). Outra sequência de sinal é a sequência
20 de aminoácidos SEKDEL para reter polipeptídeos no retículo endoplasmático (Munro et al. *Cell* 48:899 (1987)). Um polipeptídeo também pode ser direcionado para o amiloplasto por fusão ao peptídeo de direcionamento de amiloplasto ceráceo (Klosgren et al. *Mol. Gen. Genet.* 203:237 (1986)) ou para um grânulo de amido.

25 Outra modalidade da invenção é uma célula vegetal transformada, parte da planta ou uma planta compreendendo uma molécula de ácido nucleico a qual codifica um polipeptídeo compreendendo uma proteína enzimaticamente suscetível ligada operativamente a uma sequência de sinal. Em uma modalidade, a planta compreende um polipeptídeo compreendendo
30 uma sequência de sinal N-terminal gama-zeína ligada operavelmente à proteína enzimaticamente suscetível. Em outra modalidade, a planta compreende um polipeptídeo compreendendo SEKDEL ligado operavelmente ao C-

término de uma proteína enzimaticamente suscetível. Em outra modalidade, a planta compreende um polipeptídeo compreendendo um peptídeo de direcionamento para amiloplasto ceráceo N-terminal ligado operavelmente a uma proteína enzimaticamente suscetível. Em outra modalidade, a planta
5 compreende um polipeptídeo compreendendo um domínio de encapsulação de amido ceráceo ligado operavelmente ao C-término de uma proteína enzimaticamente suscetível.

Outra modalidade da invenção é um cassete de expressão compreendendo uma proteína enzimaticamente suscetível e compreendendo
10 adicionalmente um intensificador da expressão genética. Foram descobertas várias sequências que reforçam a expressão genética de dentro da unidade transcricional e estas sequências podem ser usadas em combinação com o polinucleotídeo codificando uma proteína enzimaticamente suscetível para aumentar sua expressão em plantas transgênicas.

15 Íntrons têm demonstrado o potencial para reforçar expressão do transgene. Por exemplo, Callis et al. *Genes and Develop.* 1: 1 183 (1.987) descrevem um íntron do gene de desidrogenase alcoólica com, o qual é capaz de reforçar a expressão de transgenes em células de plantas transgênicas. Do modo similar, Vasil et al. *Mol. Microbiol.* 3:371 (1989) descrevem um
20 íntron do gene da sacarose sintase do milho tendo atividade de reforço similar. O íntron da actina 1 do arroz tem sido amplamente utilizado no reforço da expressão do transgene em uma série de diferentes culturas transgênicas. (McElroy et al. *Mol. Gen. Genet.* 231:150 (1991)).

Um intensificador é uma sequência de DNA a qual pode estimular
25 lar atividade do promotor e pode ser um elemento inato do promotor ou um elemento heterólogo inserido para aumentar o nível ou preferência de tecido de um promotor em particular. Um intensificador é capaz de operar em ambas as orientações (5' para 3' e 3' para 5' em relação ao gene da sequência de polinucleotídeo de interesse), e é capaz de funcionar mesmo quando mo-
30 vido quer a montante ou a jusante do promotor. Um exemplo de um elemento intensificador é o elemento intensificador ocs. Este elemento foi identificado pela primeira vez como um intensificador palindrômico de 16 bp do gene

da octopina sintase (ocs) de *Agrobacterium* (Ellis et al. EMBO 6:3203 J. (1987)), e está presente em no mínimo 10 outros promotores (Bouchez et al. EMBO 8:4197 J. (1989)). O uso de um elemento intensificador, tal como o elemento ocs e particularmente múltiplas cópias do elemento, agirá aumentando o nível de transcrição de promotores adjacentes.

Uma série de sequências líder não-traduzidas derivadas de vírus também é conhecida para reforçar a expressão, e estas são particularmente eficazes em células de dicotiledôneas. Especificamente, foi demonstrado que sequências líder do vírus do mosaico do tabaco (TMV, a "sequência W"), do vírus da mancha clorótica do milho (MCMV) e do vírus do mosaico da alfafa (AMV) são eficazes para reforçar a expressão (por exemplo, Gallie et al. Nucl. Acids Res. 15: 8693-8711 (1987); Skuzeski Plant et al. Molec. Biol. 15: 65-79 (1990)). Outras sequências líder conhecidas na técnica incluem, mas não estão limitadas a: líderes de picornavírus, por exemplo, EMCV líder (região não codificante 5' da encefalomiocardite) (Elroy-Stein, O., Fuerst, TR, e Moss, B. PNAS USA 86: 6126-6130 (1989)); líderes de potyvirus, por exemplo, líder do TEV (vírus do *etch* do tabaco); líder do MDMV (vírus do mosaico anão do milho), líder da proteína de ligação de cadeia pesada da imunoglobulina humana (BIP), (Macejak et al. Natureza 353: 90-94 (1991); líder não traduzida do mRNA da proteína capsial do vírus do mosaico da alfafa (AMV RNA 4) (Jobling et al. Nature 325:622-625 (1987); líder do vírus do mosaico do tabaco (TMV), (Gallie, DR et al. Molecular Biology of RNA, páginas 237-256 (1989) e líder do vírus da mancha clorótica do milho (MCMV) (Lommel et al. Virology 81:382-385 (1991). Vide também, Della Cioppa et al. Fisiologia Vegetal 84:965-968 (1987). Inpact é outro método disponível para aumentar a expressão genética (requerimento de patente internacional Nº WO 01/72996).

Outra modalidade da invenção é um cassete de expressão compreendendo uma proteína enzimaticamente suscetível ligada operavelmente a um terminador de transcrição. Uma variedade de terminadores de transcrição está disponível para uso em cassetes de expressão. Terminadores de transcrição são responsáveis pela terminação da transcrição além do trans-

gene e poliadenilação de mRNA correta. Terminadores de transcrição adequados são aqueles que se sabe que funcionam em plantas e incluem, mas não estão limitados a, o terminador CaMV 35S, o terminador tml, o terminador da nopalina sintase derivado do *Agrobacterium tumefaciens* (Bevan et al. Nucl. Acids Res., 11 : 369 (1983)) e o terminator rbcS E9 da ervilha, o terminador para o transcrito T7 do gene octopina sintase de *Agrobacterium tumefaciens*, e a extremidade 3' dos genes I ou II inibidores de protease de batata ou tomate. Elementos regulatórios tais como Adh íntron 1 (Callis et al. Genes and Develop., 1:1183 (1987)), íntron de sacarose sintase (Vasil et al. Plant Physiol. 91: 1575 (1989)) ou elemento ômega do TMV (Gallie, et al. Plant Cell 1:301 (1989)), podem ser adicionalmente incluídos caso desejado. Regiões de terminação de vegetais convenientes estão disponíveis a partir do plasmídeo-Ti de *A. tumefaciens*, tais como as regiões de terminação de octopina sintase e nopalina sintase. Vide também, Guerineau et al. Mol. Gen. Genet, 262:141 Mogen (1991); et al. Plant Cell, 2:1261 (1990); Munroe et al. Gene, 91:151 (1990); Ballas et al. Nucleic Acids Res., 17:7891 (1989); Joshi et al. Nucleic Acids Res., 15:9627 (1987). Estas também podem ser usadas tanto em monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas. Além disso, pode ser usado um terminador de transcrição de nativo do gene.

Outros elementos reguladores incluem aqueles que podem ser regulados por agentes endógenos ou exógenos, por exemplo, por proteínas de dedo de zinco, incluindo proteínas dedo de zinco que ocorrem naturalmente ou proteínas dedo de zinco quiméricas. Vide, por exemplo, a Patente U.S. Nº 5.789.538, a patente internacional Nº WO 99/48909, a patente internacional Nº WO 99/45132; a patente internacional Nº WO 98/53060, a patente internacional Nº WO 98/53057; a patente internacional Nº WO 98/53058, a patente internacional Nº WO 00/23464; a patente internacional Nº WO 95/19431 e a patente internacional Nº WO 98/54311.

Outra modalidade da invenção é um vetor de transformação compreendendo uma proteína enzimaticamente suscetível que é adequada para transformação de bactérias. Tipicamente, um vetor de expressão bacteriano contém (1) elementos de DNA procarióticos codificando para uma ori-

gem bacteriana de replicação e um gene de resistência a antibióticos para proporcionar a ampliação e seleção do vetor de expressão em um hospedeiro bacteriano, (2) elementos de DNA que controlam a iniciação da transcrição, tal como um promotor; (3) elementos de DNA que controlam o processamento de transcritos (4); elementos intensificadores e (5) um gene de interesse que é ligado operativamente aos elementos de DNA que controlam a iniciação da transcrição. O vetor de expressão usado pode ser um vetor capaz de replicar de modo autônomo no hospedeiro acima (tal como em um plasmídeo) ou capaz de integrar dentro do cromossomo, contendo originalmente um promotor em um sítio que possibilite transcrição do gene encadeado codificando para uma proteína enzimaticamente suscetível.

Vetores adequados incluem a título de exemplo: para bactérias, pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pBluescript II (Stratagene), pTRC99a, pKK223-3, pDR540, pRIT2T (Pharmacia). Semelhantes vetores comerciais incluem, por exemplo, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia) and GEMI (Promega Biotec, Madison, Wis., E.U.A.). No entanto, pode ser usado qualquer outro plasmídeo ou vetor à medida que eles sejam replicáveis e viável no hospedeiro.

Como exemplos representativos de hospedeiros bacterianos adequados, podem ser mencionados: células bacterianas, tais como *E. coli*, *Streptomyces*, *Bacillus subtilis*; e várias espécies dentro dos gêneros *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Microbacterium*, e *Staphylococcus*, embora outras também possam ser empregadas como uma questão de escolha.

Outra modalidade da invenção é um vetor de transformação compreendendo uma proteína enzimaticamente suscetível capaz de transformar fungo. Transformação de fungo pode ser realizada de acordo com Gonni et al. Agric. Biol. Chem., 51:2549 (1987). Como exemplos representativos de hospedeiros fúngicos apropriados, podem ser mencionados: células fúngicas, tais como células fúngicas pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Mucor*, *Penicillium*, e etc., tais como leveduras pertencentes aos gêneros *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Schi-*

zosaccharomyces, Trichosporon, Schwanniomyces, e etc.

Outra modalidade da invenção é um vetor de transformação compreendendo uma proteína enzimaticamente suscetível capaz de transformar uma célula eucariótica. Uma série de linhagens de células eucarióticas (incluindo células de animais e de insetos) está disponível como hospedeiros que podem ser transformados para expressar uma proteína enzimaticamente suscetível. Células de insetos tais como Drosophila S2 e Spodoptera Sf9; células de animais tais como linhagens de células CHO, COS ou melanoma de Bowes, C 127, 3T3, CHO, HeLa e BHK. Pode ser usado qualquer hospedeiro na medida em que possa expressar o gene de interesse. A American Type Culture Collection (<http://www.atcc.org/>) mantém linhagens celulares de uma ampla variedade de fontes e muitas destas culturas podem ser usadas para gerar uma linhagem de células transgênicas capazes de expressar uma proteína enzimaticamente suscetível. Vetores de transformação apropriados para células eucarióticas estão disponíveis comercialmente tais como pXTI, pSG5 (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, e pSVLSV40 (Pharmacia). Técnicas para transformação e seleção de células eucarióticas transgênicas são de conhecimento geral na técnica.

Outra modalidade da invenção é um vetor de transformação compreendendo uma proteína enzimaticamente suscetível capaz de transformar uma planta. Uma descrição geral de vetores de transformação de plantas, cassetes de expressão e genes repórter pode ser encontrada em Gruber, et al., Methods in Plant Molecular Biology & Biotechnology, Glich et al., Eds. pp. 89-119, CRC Press (1993).

Em determinadas modalidades, é contemplado que se pode desejar empregar vetores virais competentes para replicação em transformação de monocotiledôneas. Os vetores referidos incluem, por exemplo, vetores de "vai-vém" do vírus do trigo anão pWI-11 e pWI - GUS (Ugaki et al., Nucl. Acids Res., 19:371 (1991)). Estes vetores são capazes de replicação autônoma em células de milho, bem como em E. coli, e deste modo podem proporcionar sensibilidade aumentada para detectar DNA liberado para células transgênicas. Um vetor de replicação também pode ser útil para libera-

ção de genes flanqueado por sequências de DNA de elementos transponíveis tais como Ac, Ds, ou Mu. Também é contemplado que elementos transponíveis seriam úteis para introduzir fragmentos de DNA carecendo de os elementos necessários para seleção e manutenção do vetor de plasmídeo em bactérias, por exemplo, genes de resistência a antibióticos e origens de replicação de DNA. Também é proposto que o uso de um elemento transponível tal como Ac, Ds, ou Mu promoveria ativamente a integração do DNA desejado e deste modo aumentaria a frequência de células transformadas de modo estável.

10 A construção de vetores os quais podem ser empregados em combinação com a invenção será de conhecimento daqueles versados na técnica à luz da presente descoberta (vide, por exemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York) (1989); Gelvin et al., Plant Molecular Biology Manual (1990)).

15 São descritos métodos de preparar e usar ma molécula de ácido nucleico (polinucleotídeo), a qual codifica uma proteína enzimaticamente suscetível. É de conhecimento na técnica que a expressão da proteína pode ser reforçada otimizando as regiões codificantes de genes para a preferência de códon do hospedeiro. Para expressão em uma célula hospedeira microbiana, tal como leveduras, bactérias, fúngicas e outras, pode ser necessário otimizar o códon do ORF para expressão microbiana. Por conseguinte, o uso do códon preferencial em plantas difere do uso do códon preferencial de determinados micro-organismos. A comparação do uso de códons dentro de um ORF microbiana clonada para uso em genes de plantas (e em particular genes da planta-alvo) possibilitará uma identificação dos códons dentro do ORF os quais devem ser alterados preferencialmente. Tipicamente a evolução da planta tendeu para uma forte preferência dos nucleotídeos C e G na posição da terceira base de monocotiledôneas, ao passo que dicotiledôneas frequentemente usam os nucleotídeos A ou T nessa posição. Modificando um gene para incorporar o uso de códon preferencial para uma espécie transgênica alvo em particular, podem ser superados muitos dos problemas

associados com expressão genética eficiente em plantas. Em resumo, é obtida uma tabela de uso de códon indicando códons ótimos usados pelo organismo alvo e códons ótimos são escolhidos para substituir aqueles no polinucleotídeo-alvo e a sequência otimizada é em seguida sintetizada quimicamente. Códons preferenciais para milho são descritos na Patente U.S. Nº 5.625.136.

Uma variedade de técnicas está disponível e é de conhecimento daqueles versados na técnica para introdução de construtos em um hospedeiro celular. Uma modalidade da invenção é um hospedeiro transgênico em que uma sequência de polinucleotídeos codificando uma proteína enzimaticamente suscetível é mantida pelo hospedeiro. O hospedeiro pode ser selecionado entre o grupo consistindo em bactérias, células eucarióticas, células de animais, células de insetos, células fúngicas, células de leveduras e plantas.

A transformação de bactérias e de muitas células eucarióticas pode ser realizada através do uso de polietileno glicol, cloreto de cálcio, infecção viral, dextrano DEAE, infecção de fago, eletroporação e outros métodos conhecidos na técnica. A introdução do vetor recombinante em leveduras pode ser realizada através de métodos, incluindo eletroporação, uso de esferoplastos, acetato de lítio, e semelhantes. Pode ser usado qualquer método capaz de introduzir DNA em células animais: por exemplo, eletroporação, fosfato de cálcio, lipofecção, e semelhantes.

O cassete de expressão pode ser inserido em uma célula de inseto usando um baculovírus (Vide, por exemplo, Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual (1992)). Por exemplo, o vetor no qual o gene recombinante foi introduzido pode ser introduzido junto com baculovírus em uma célula de inseto de tal modo que um vírus recombinante é obtido no sobrenadante das células de inseto cultivadas. Células de inseto são então infectadas com o vírus recombinante por meio do qual a proteína pode ser expressa. O vetor de introdução de gene usado neste método pode incluir, por exemplo, pLV1392, pVL1393, e pBlueBacIII (os quais são todos produtos da Invitrogen). O baculovírus pode ser, por exemplo, vírus da poli-hidrose nuclear *Autographa californica*, o qual é um vírus que infecta alguns insetos

de traças. As células do inseto podem ser células de ovário Sf9 e Sij/21 de *Spodoptera frugiperda* e High 5 (Invitrogen), a qual é uma célula de ovário de *Trichoplusia ni*, e etc. Para cointrodução de ambos o vetor tendo o gene recombinante quanto do baculovírus em uma célula de inseto para preparar um vírus recombinante, podem ser usados os métodos de fosfato de cálcio ou de lipofecção.

Plantas hospedeiras usadas para transformação podem ser de qualquer espécie vegetal, incluindo, mas não limitadas a, milho (*Zea mays*), *Brassica* sp. (Por exemplo, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), particularmente as espécies *Brassica* úteis como fontes de óleo de semente, tais como canola, alfafa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa* L.), centeio (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), milhete (ex, milhete pérola (*pearl millet*, *Pennisetum glaucum*), milhete proso (*Panicum miliaceum*), milhete rabo-de-raposa (*Setaria italica*), milheto capim capim-pé-de-galinha (*Eleusine coracand*), girassol (*Helianthus annuus*), açafraão (*Carthamus tinctorius*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), batata (*Solanum tuberosum*), amendoim (*Arachis hypogaea*), algodão (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), batata-doce (*Ipomoea batatas*), mandioca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea* spp.), coco (*Cocos nucifera*), abacaxi (*Ananas comosus*), árvores cítricas (*Citrus* spp.), cacau (*Theobroma cacao*), chá (*Camellia sinensis*), banana (*Musa* spp.), abacate (*Persea americana*), figo (*Ficus casica*), goiaba (*Psidium guajava*), manga (*Mangifera indica*), oliveira (*Olea europaea*), mamão papaia (*Carica papaya*), caju (*Anacardium occidentale*), macadâmia (*Macadamia integrifolia*), amêndoa (*Prunus amygdalus*), beterrabas-sacarinas (*Beta vulgaris*), cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), aveia, cevada, verguras e legumes, plantas ornamentais, e coníferas.

Verduras e legumes incluem tomate (*Lycopersicon esculentum*), alface (por exemplo, *Lactuca sativa*), feijões verdes (*Phaseolus vulgaris*), feijões-de-lima (*Phaseolus limensis*), ervilhas (*Lathyrus* spp.), e membros do gênero *Cucumis* tais como pepino (*C. sativus*), cantalupo (*cantalupensis* C) e melão almiscarado (*C. melo*). Plantas ornamentais incluem azaleia (*Rhododendron* spp.), hortênsia (*Hydrangea macrophylla*), hibisco (*Hibiscus rosas-*

nensis), rosas (*Rosa* spp.), tulipas (*Tulipa* spp.), narcisos (*Narcissus* spp.), petúncias (*Petunia* hybrida), cravo (*Dianthus caryophyllus*), poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*), e crisântemo. Coníferas que podem ser empregadas incluem, por exemplo, pinheiros tais como espécie de pinheiro teca (*Pinus taeda*), pinheiro shash (*Pinus elliotti*), pinheiro ponderosa (*Pinus ponderosa*), pinheiro lodgepole (*Pinus contorta*) e pinheiro Monterey (*Pinus radiata*), conífera norte-americana Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*); cicuta ocidental (*Tsuga canadensis*); Sitka spruce (*Picea glauca*); sequóia (*Sequoia sempervirens*), abetos verdadeiros tais como abeto prata (*Abies amabilis* prata) e abeto balsâmico (*Abies balsamea*) e cedros tais como cedro vermelho ocidental (*Thuja plicata*) e cedro amarelo do Alasca (*Chamaecyparis nootkatensis*). Plantas leguminosas incluem feijões e ervilhas. Feijões incluem feijão guar, alfarroba, feno-grego, soja, feijões de jardim (*garden beans*), feijão-de-corda, *mungbean*, feijão-de-lima, feijão de fava, lentilhas, grão de bico, e etc.

Legumes incluem, mas não estão limitados a, *Arachis*, por exemplo, amendoim, *Vicia*, por exemplo, ervilhaca de coroa, ervilhaca peluda, feijão adzuki, feijão de mung, e grão de bico, tremoço, por exemplo, tremoço, Trifólio, *Phaseolus*, por exemplo, feijão comum e feijão-de-lima, *Pisum*, por exemplo, feijão branco, *Melilotus*, por exemplo, trevo, *Medicago*, por exemplo, alfafa, Lotus, por exemplo, trevo, lentinhas, por exemplo, lentilha, e falso índigo. Grama de forragem e de relvado para uso como plantas hospedeiras incluem, mas não estão limitadas a alfafa, grama de pomar, festuca, azevém perene, agróstea rasteira, switchgrass (*Panicum virgatum*), *Miscanthus* e capim-panasco.

Plantas hospedeiras incluem, mas não estão limitadas a, plantas de colheitas ou plantas usadas para produzir alimento ou ração, por exemplo, milho, alfafa, girassol, *Brassica*, soja, algodão, girassol, açafrão, amendoim, sorgo, trigo, aveia, centeio, milhete, tabaco, cevada, arroz, tomate, batata, abóbora, melões, cana de açúcar, leguminosas, por exemplo, ervilha, feijão e soja, e tubérculos/raízes amiláceos, por exemplo, batata, batata-doce, mandioca, inhame, cana-de-açúcar, beterraba-sacarina e açúcar e semelhantes.

Técnicas de transformação para plantas são de conhecimento

geral na arte e incluem técnicas à base de *Agrobacterium* e técnicas que não necessitam de *Agrobacterium*.

Técnicas não-*Agrobacterium* envolvem a captação de material genético exógeno diretamente por protoplastos ou células. Isso pode ser
5 realizado por meio de captação mediada por eletroporação ou PEG, liberação mediado por bombardeamento de partículas, ou microinjeção. Exemplos destas técnicas são descritos por Paszkowski et al., EMBO J 3:2717- 2722 (1984), Potrykus et al., Mol. Gen. Genet. 199:169-177 (1985), Reich et al., Biotechnology 4:1001-1004 (1986), e Klein et al., Nature 327:70-73 (1987).
10 Também foi descrita a transformação de monocotiledôneas usando *Agrobacterium*. Vide, a patente internacional Nº WO 94/00977 e a Patente U.S. Nº 5.591.616. Em cada caso as células transformadas são regenerados para plantas inteiras usando técnicas de rotina conhecidas na técnica.

Muitos vetores estão disponíveis para transformação usando
15 *Agrobacterium tumefaciens*. Estes tipicamente carregam no mínimo uma sequência de limite T-DNA e incluem vetores tais como pBIN19 (Bevan, Nucl. Acies Res. 11 :369 (1984)). O vetor binário pCIBIO contém um gene codificando resistência a canamicina para seleção em plantas e sequências de limite esquerdo e direito de T- DNA e incorporam sequências do plasmídeo
20 pRK252 de ampla gama de hospedeiros possibilitando qee replique tanto em *E. coli* quanto em *Agrobacterium* (Rothstein et al. Gene 53:153-161 (1987)).

A transformação das espécies de plantas alvo por *Agrobacterium* recombinante geralmente envolve cocultivo do *Agrobacterium* com explantes da planta e segue protocolos de conhecimento geral na técnica. Te-
25 cido transformado é regenerado sobre meio selecionável carregando o presente marcador de resistência a antibiótico ou herbicida entre os limites de T-DNA do plasmídeo binário.

Outra abordagem para transformar uma célula de planta com um gene envolve propulsão de partículas inertes ou biologicamente ativas em
30 tecidos e células vegetais. Esta técnica é revelada nas Patentes U.S. Nºs 4.945.050, 5.036.006 e 5.100.792. De modo geral, este procedimento envolve propulsão de partículas inertes ou biologicamente ativas nas células sob

condições eficazes para penetrar na superfície externa da célula.

Os requerimentos de patente Europeia Nº EP 0292 435, EP 0392 225 e o requerimento de patente internacional Nº WO 93/07278 descrevem técnicas para a preparação de calos e protoplastos a partir de uma
5 linhagem endógama elite de milho, transformação de protoplastos usando PEG ou eletroporação, e a regeneração de plantas de milho a partir de protoplastos transformados. Gordon-Kamm et al. Plant Cell 2:603-618 (1990) and Fromm et al. Biotechnology 8:833-839 (1990) publicaram técnicas para transformação da linhagem de milho A188-derivada usando bombardeamento de partículas. Além disso, o requerimento de patente internacional Nº
10 WO 93/07278 e Koziel et al. Biotechnology 11: 194- 200 (1993) descrevem técnicas para a transformação de linhagens endógamas elites de milho por bombardeamento de partículas.

Foi descrita a transformação de plastídios usando bombardeamento de partículas (Svab et al. PNAS 90:913-917 (1993); Svab et al. PNAS 87:8526-8530 (1990); McBride et al. PNAS 91:7301-7305 (1994)). A transformação de plastídios pode ser usada para produzir plantas expressando a proteína enzimaticamente suscetível sem a necessidade de transformação do genoma nuclear. Métodos para transformação de plastídios são de conhecimento geral na técnica.
15
20

A seleção de células transformadas é facilitada pelo uso de marcadores de seleção de antibiótico ou herbicida os quais são ligados operavelmente a sequência de polinucleotídeos codificando uma proteína enzimaticamente suscetível. Para algumas espécies-alvos, podem ser preferenciais diferentes marcadores de seleção de antibiótico ou herbicida. Marcadores de seleção usados rotineiramente em transformação incluem o gene nptII, o qual confere resistência à canamicina e antibióticos relacionados (Messing et al. Gene 19:259-268 (1982); Bevan et al., Nature 304:184-187 (1983)), o gene bar, o qual confere resistência ao herbicida fosfinotricina (White et al., Nucl. Acids Res 18:1062 (1990), Spencer et al. Theor. Appl. Genet 79:625-631 (1990)), o gene hph, o qual confere resistência ao antibiótico higromicina (Blochinger et al. Mol Cell Biol 4:2929-2931), e o gene dhfr, o qual confere
25
30

resistência a metatrexato (Bourouis et al., EMBO J. 2(7): 1099- 1104 (1983)), o gene EPSPS, o qual confere resistência a glifosato (Patentes U.S. N^{os} 4.940.835 e 5.188.642), e o gene manose-6-fosfato isomerase (também referido aqui, neste requerimento de patente, como o gene fosfomanose isomerase), o qual proporciona a capacidade para metabolizar manose (Patentes U.S. N^{os} 5.767.378 e 5.994.629).

Outra modalidade da invenção é um hospedeiro transgênico em que a sequência de polinucleotídeos codificando uma proteína enzimaticamente suscetível é cromossomicamente integrada. Integração cromossômica se refere à integração de um gene estranho ou constructo de DNA dentro do DNA do hospedeiro por ligações covalentes. DNA cromossomicamente integrado é geneticamente estável e transmissível para a progênie através das gerações sucessivas. Outra modalidade da invenção é uma célula hospedeira transgênica em que o polinucleotídeo codificando uma fitase enzimaticamente suscetível é expresso transitoriamente. Expressão transiente de um gene se refere à expressão de um gene que não está integrado no cromossomo hospedeiro, mas funciona de modo independente, quer como parte de um plasmídeo replicante de modo autônomo quer como cassete de expressão.

Plantas hospedeiras transformadas com uma proteína enzimaticamente suscetível podem propagar a sequência de polinucleotídeos codificando uma proteína enzimaticamente suscetível em outras variedades da mesma espécie, particularmente incluindo variedades comerciais, usando técnicas de reprodução tradicionais (Plant Breeding Reviews Vol. 14, Edited by Jules Janick, John Wiley & Sons Publisher (1997)). Outra modalidade da invenção é plantas transgênicas compreendendo uma proteína enzimaticamente suscetível além de outras sequências transgênicas. Plantas transgênicas compreendendo uma proteína enzimaticamente suscetível podem ser cruzadas com outras plantas transgênicas usando técnicas de reprodução tradicionais para empilhar uma ou mais características transgênicas em uma única planta ou híbrido.

Em uma modalidade do método da invenção, a proteína enzima-

ticamente suscetível acumula na semente da planta. Outra modalidade da invenção é a semente de uma planta transgênica compreendendo a proteína enzimaticamente suscetível. Plantas hospedeiras compreendendo uma proteína enzimaticamente suscetível podem ter uma variedade de formas. As plantas hospedeiras podem ser quimeras de células transformadas e células não transformadas, as plantas hospedeiras pode ser transformantes clonais (por exemplo, todas as células transformadas para conter o cassete de expressão), as plantas hospedeiras podem incluir enxertos de tecidos transformados e não transformados (por exemplo, um estoque de raiz transformada enxertado em um rebento não transformado, isto é, espécie de cítrico). As plantas hospedeiras podem ser propagadas por uma variedade de meios tais como por propagação clonal ou técnicas de reprodução clássicas. Por exemplo, a primeira geração (ou T1) de plantas transformadas pode ser autofecundada para dar a segunda geração homozigótica (ou T2) de plantas transformadas, e as plantas T2 adicionalmente propagadas através de técnicas de reprodução clássicas. Um marcador selecionável dominante (tal como npt II) pode ser associado com o cassete de expressão para auxiliar na reprodução.

Técnicas de design racional para engenharia de proteínas conforme descritas acima foram demonstradas usando a enzima fitase, Nov9X, para gerar enzimas fitase enzimaticamente suscetíveis com sensibilidade para a protease pepsina. Nov9X é uma fitase derivada do gene appa de *Escherichia Coli* modificado para elevada termoestabilidade bem como expressão otimizada em plantas de milho. O termo "fitase" descreve uma ampla gama de classe de enzimas que catalisam fitato (mio-inositol-hexafosfato) em fosfato de inositol e inorgânico. Enzimas fitase têm sido identificadas em múltiplas fontes de organismos procarióticos e eucarióticos (isto é, *Aspergillus ficuum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, e etc). Uma modalidade da invenção é uma fitase enzimaticamente suscetível codificada por uma das sequências de polipeptídeos de SEQ ID NO: 1-33 ou um polipeptídeo com 98% de identidade com uma das sequências de polipeptídeos de SEQ ID NO: 1-33 ou uma variante conservadora de uma das sequências de polipeptídeos de SEQ ID NO: 1-33.

Para comparação de sequências, tipicamente uma sequência age como uma sequência de referência à qual sequências de teste são comparadas. Ao usar um algoritmo de comparação de sequências, sequências de teste e de referência são introduzidas em um computador, caso necessário são designadas coordenadas subsequentes, e são designados parâmetros do programa de algoritmo de sequências. O algoritmo de comparação de sequências em seguida calcula a percentagem de identidade de sequência para a uma ou mais sequências de teste em relação à sequência de referência, com base nos parâmetros do programa designado.

Ótimo alinhamento de sequências para comparação pode ser conduzido, por exemplo, pelo algoritmo de homologia local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), pelo algoritmo de alinhamento de homologia de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), pelo método de pesquisa de similaridade de Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), por implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, e TFASTA no pacote de programas Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), ou por inspeção visual.

Um exemplo de um algoritmo que é adequado para determinar a percentagem de identidade de sequência e similaridade de sequência é o algoritmo BLAST, o qual é descrito em Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990). O programa para realização de análises BLAST está disponível publicamente através do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo envolve primeiro identificar pares de sequências de alta pontuação (HSPs), identificando palavras curtas de comprimento W na sequência de query, as quais ou igualam ou satisfazem algum escore de limiar T de valor positivo quando alinhadas com uma palavra do mesmo comprimento em uma sequência do banco de dados. T é referido como o limiar de escore de palavra vizinha (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990)). Estes hits de palavra vizinha inicial agem como sementes para iniciar pesquisas para descobrir HSPs mais longas contendo as mesmas. Os hits de palavras são então estendidos em ambas as direções ao longo de cada

sequência por tão longe quanto a pontuação de alinhamento cumulativa possa ser aumentada. Pontuações cumulativas são calculadas usando, para sequências de nucleotídeos, os parâmetros M (escore de recompensa para um par de resíduos correspondentes; sempre > 0) e N (escore de penalidade para resíduos correspondendo mal; sempre < 0). Para sequências de aminoácidos, uma matriz de pontuação é usada para calcular o escore cumulativo. Extensão dos hits de palavra em cada direção é interrompida quando o escore de alinhamento cumulativo cai pela quantidade X de seu valor máximo obtido, o escore cumulativo vai para zero ou abaixo de zero, devido ao acúmulo de um ou mais alinhamentos de resíduos de pontuação negativa, ou o final de cada sequência é atingido. Os parâmetros do algoritmo BLAST W, T, e X determinam a sensibilidade e a velocidade do alinhamento. O programa BLASTN (para sequências de nucleotídeos) usa como padrões um comprimento de palavra (W) de 11, uma expectativa (E) de 10, um corte de 100, M=5, N=-4, e uma comparação de ambos os filamentos. Para sequências de aminoácidos, o programa BLASTP usa como padrões um comprimento de palavra (W) de 3, uma expectativa (E) de 10, e a matriz de pontuação BLOSUM62 (vide Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)).

Além de calcular a percentagem de identidade de sequência, o algoritmo BLAST também realiza uma análise estatística da similaridade entre duas sequências (vide, por exemplo, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Uma medida de similaridade proporcionada pelo algoritmo BLAST é a probabilidade de menor soma ($P(N)$), a qual proporciona uma indicação da probabilidade pela qual uma combinação entre duas sequências de nucleotídeos ou de aminoácidos ocorreria por acaso. Por exemplo, uma sequência de ácidos nucleicos de teste é considerada similar a uma sequência de referência se a probabilidade de menor soma em uma comparação da sequência de ácido nucleico de teste com a sequência de ácido nucleico de referência for menos de cerca de 0,1, mais preferivelmente menos de cerca de 0,01, e o mais preferencialmente, menos de cerca de 0,001.

Uma preparação contendo a fitase enzimaticamente sensível

pode assumir muitas formas incluindo, mas não limitadas a, uma preparação seca, uma preparação líquida, uma preparação contendo material de plantas transgênicas e semelhantes.

Em uma modalidade da invenção, o método compreende adicionalmente isolar a fitase enzimaticamente suscetível. A fitase enzimaticamente suscetível é isolada a de qualquer hospedeiro expressando a enzima fitase. O hospedeiro pode ser transgênico ou pode expressar a fitase enzimaticamente suscetível transitoriamente. A célula hospedeira é selecionada entre o grupo consistindo em bactérias, leveduras, fungos, insetos e plantas.

5

10 A célula hospedeira da planta pode ser monocotiledônea, tal como uma célula de milho ou trigo ou dicotiledônea, tal como uma célula de soja.

Outra modalidade da invenção é um extrato de um hospedeiro contendo uma enzima fitase enzimaticamente suscetível. Para preparação de fitase recombinante, depois da transformação de um hospedeiro adequado e crescimento do hospedeiro, um promotor selecionado pode ser induzido por meios adequados (por exemplo, mudança de temperatura ou indução química) e as células cultivadas por um período adicional para produzir enzima recombinante. As células são então tipicamente colhidas por centrifugação, rompidas por meios físicos ou químicos, e o extrato bruto resultante

15

20 retido para purificação adicional.

Células empregadas em expressão de proteínas podem ser rompidas por qualquer método conveniente, incluindo ciclagem de congelamento-descongelamento, sonicação, ruptura mecânica ou uso de agentes de lise celular, os métodos referidos são de conhecimento geral daqueles versados na técnica.

25

A enzima pode ser recuperada a partir de culturas de células recombinantes por meio de métodos incluindo precipitação de etanol ou sulfato de amônio, extração de ácido, cromatografia de troca aniônica ou catiônica, cromatografia de fospocelulose, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia por afinidade, cromatografia de hidroxapatita e cromatografia de lectina. Podem ser usadas etapas de redobramento de proteína, conforme necessário, para completar a configuração da proteína madura. Final-

30

mente, pode ser empregada cromatografia líquida de alta performance (CLAE) para etapas de purificação final. Recuperação da enzima se refere a qualquer método usado para coletar a enzima do hospedeiro. Preparações enzimáticas recuperadas podem conter contaminantes tais como proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA do hospedeiro. Preparações enzimáticas recuperadas também podem ser preparações enzimáticas altamente purificadas as quais são superiores a 95% de proteína pura.

O extrato contendo uma fitase enzimaticamente suscetível pode ser um produto de procedimentos químicos sintéticos, ou produzido por técnicas de recombinação a partir de um hospedeiro. O hospedeiro pode ser um hospedeiro procariótico tal como bactérias ou um hospedeiro eucariótico, tal como uma planta superior.

O extrato contendo uma enzima fitase enzimaticamente suscetível pode ser empregado para qualquer fim no qual a atividade da enzima referida seja necessária ou desejada. Uma modalidade da invenção é um método de produção de ração animal em que uma fitase enzimaticamente sensível é empregada para catalisar a hidrólise de fitato em ração animal. Em outra modalidade, a enzima é empregada para catalisar a hidrólise de fitato em alimento.

Outra modalidade da invenção é uma composição líquida contendo uma enzima fitase enzimaticamente suscetível. Composições líquidas não precisam conter nada além da enzima fitase. No entanto, pode ser adicionado um estabilizador, tal como o glicerol, sorbitol ou mono propilenoglicol. A composição líquida também pode compreender outros aditivos, tais como sais, açúcares, conservantes, agentes de ajuste do pH, proteínas e fitato (um substrato da fitase). Composições líquidas típicas são aquosas ou pastas semifluidas à base de óleo. As composições líquidas podem ser adicionadas a um alimento ou ração antes ou depois de uma peletização opcional da composição da ração.

Outra modalidade da invenção é uma composição seca contendo uma fitase enzimaticamente suscetível. Composições secas podem ser composições secas por congelamento ou secas por pulverização, caso no

qual a composição não precisa conter nada além da fitase em uma forma seca. Composições secas podem ser granulados os quais podem ser prontamente misturados com, por exemplo, componentes de alimento ou ração, ou formar um componente de uma pré-mistura. O tamanho de partícula dos
5 granulados de enzimas é compatível com o dos outros componentes da mistura. Isto proporciona um meio seguro e conveniente de incorporar fitases em, por exemplo, alimentos e rações animais processados.

Por exemplo, uma formulação de enzima fitase estável pode ser preparada por congelamento de uma mistura de solução enzimática líquido
10 com um agente de volume, tal como farelo de soja chão e, em seguida liofilizando a mistura. A redução da umidade e as interações de ligação da fitase com o agente de volume protegem a enzima contra fatores ambientais externos, tais como os extremos de temperatura experimentados durante a fabricação de ração composta. Formulações a seco podem reforçar adicionalmente a estabilidade minimizando a atividade de enzimas proteolíticas
15 potenciais que podem estar presentes como subprodutos da mistura de fermentação líquida usada para fabricar a enzima-alvo. A mistura de enzima e farinha de soja seca resultante pode suportar extremos de temperatura elevados. A mistura de enzimas formulada pode ser usada como um suplemento de ração para uso em produção avícola e suína.
20

Outra modalidade da invenção é uma planta ou parte de planta contendo uma enzima fitase enzimaticamente suscetível. Plantas ou partes da planta podem ser usadas como um mecanismo de liberação para a enzima. Plantas podem ser selecionadas entre o grupo consistindo de milho,
25 trigo, soja e um grão de quaisquer dessas plantas. O grão intacto protege a enzima-alvo contra fatores ambientais externos. A enzima contendo grãos pode ser adicionada à ração animal sob a forma de sementes rachadas, sementes trituradas, ou em uma forma mais refinada. Alternativamente, um extrato de proteína pode ser preparado a partir de sementes, e o extrato pode ser adicionalmente processado ou em um líquido estabilizado ou em um
30 estado seco por liofilização ou secagem por pulverização.

Outra modalidade da invenção é uma composição compreen-

dendo uma enzima fitase enzimaticamente suscetível. Um exemplo de uma composição é granulado de aglomeração. Granulados de aglomeração são preparados usando técnicas de aglomeração em um misturador de alto cisalhamento, durante a qual um material de enchimento e a enzima são co-

5 aglomerados para formar grânulos. Granulados de absorção são preparados tendo núcleos de um material de veículo para absorver / ser revestido pela enzima.

Composições ou grânulos de aglomeração também podem conter materiais de enchimento. Materiais de enchimento típicos são sais tais

10 como sulfato dissódico. Outros enchimentos incluem caulim, talco, silicato de alumínio de magnésio e fibras de celulose. Opcionalmente, aglutinantes, tais como dextrina também estão incluídos em granulados de aglomeração.

Composições ou grânulos de aglomeração também podem conter materiais de veículo. Materiais de veículo típicos incluem amido, por

15 exemplo, sob a forma de mandioca, milho, batata, arroz e trigo. Também podem ser usados sais.

Opcionalmente, os granulados são revestidos com uma mistura de revestimento. Uma mistura semelhante compreende agentes de revestimento, preferencialmente agentes de revestimento hidrofóbico, tais como

20 óleo de palma hidrogenado e sebo bovino e, caso desejado, outros aditivos, tais como carbonato de cálcio ou caulim.

Adicionalmente, composições podem conter outros substituintes tais como agentes corantes, compostos de aroma, estabilizantes, vitaminas, minerais, outras enzimas de reforço de ração ou alimentar, e etc. Isto é des-

25 te modo, em particular para as chamadas pré-misturas. Uma modalidade da invenção é uma pré-mistura compreendendo uma enzima fitase enzimaticamente suscetível.

Outra modalidade da invenção é um aditivo de ração ou alimento compreendendo uma fitase termotolerante enzimaticamente suscetível. Um

30 aditivo de ração ou alimento é um composto essencial puro ou uma composição de multicomponentes destinados a ou adequados para serem adicionados à ração ou ao alimento. É uma substância que, pelo seu uso preten-

dido está se tornando um componente de um produto de ração ou alimento ou afeta quaisquer características de um produto de ração ou alimento. Portanto, entende-se que um aditivo de fitase enzimaticamente suscetível significa uma fitase a qual não é um constituinte natural das substâncias da ração ou alimento principal ou não está presente em sua concentração natural nesta/neste, por exemplo, a fitase enzimaticamente suscetível é adicionada à ração separadamente das substâncias da ração, sozinha ou em combinação com outros aditivos da ração, ou a fitase enzimaticamente suscetível é uma parte integral de uma das substâncias da ração, mas foi produzida na mesma por meio de tecnologia de DNA recombinante. Um aditivo típico geralmente compreende um ou mais compostos tais como vitaminas, minerais e enzimas de reforço alimentar e veículos e/ou excipientes adequados.

Um aditivo de fitase enzimaticamente suscetível pronto para uso é definido aqui, neste requerimento de patente, como um aditivo que não é produzido in situ em ração animal ou em alimento processado. Um aditivo de fitase enzimaticamente suscetível pronto para uso pode ser fornecido a seres humanos ou animais diretamente ou, preferencialmente, logo depois de misturar com outros constituintes da ração ou alimento. Por exemplo, um aditivo de ração pode ser combinado com outros componentes de ração para produzir ração. Os outros componentes de ração referidos incluem um ou mais suplementos de enzimas diversos, aditivos de ração de vitaminas, aditivos de ração de minerais e aditivos de ração de aminoácidos. O aditivo de ração resultante (combinado) incluindo possivelmente vários tipos de compostos diferentes pode ser então misturado em uma quantidade apropriada com os outros componentes da ração, tais como suplementos de cereais e proteínas para formar uma ração animal. O processamento destes componentes em uma ração animal pode ser realizado usando meios de quaisquer dos equipamentos de processamento usados atualmente, tais como uma máquina de dupla peletização, um peletizador a vapor, um expensor ou um extrusor. Outra modalidade da invenção é uma ração animal compreendendo uma enzima fitase enzimaticamente suscetível.

Outra modalidade da invenção é um aditivo alimentar compre-

endendo uma fitase enzimaticamente suscetível compreendendo adicionalmente outros componentes alimentares para produzir produtos alimentares processados. Os outros componentes alimentares referidos incluem um ou mais suplementos de enzimas diversos, aditivos alimentares de vitaminas e aditivos alimentares de minerais. O aditivo alimentar resultante (combinado), incluindo possivelmente vários tipos de compostos diferentes pode ser misturado em uma quantidade apropriada, com os outros componentes alimentares, tais como cereais e proteínas vegetais para formar um produto alimentar processado. O processamento destes componentes em um produto alimentar processado pode ser realizado usando quaisquer dos equipamentos de processamento usados atualmente. Um aditivo de ração animal é suplementado para o animal antes ou simultaneamente com a dieta. A fitase enzimaticamente suscetível pode estar ativa durante a fabricação somente e não pode estar ativa no produto de ração ou alimentar final. Este aspecto é particularmente relevante, por exemplo, em fabricação e cozimento de massa e na produção de outros produtos à base de cereais prontos para ingestão.

Uma modalidade da invenção é criar enzimas enzimaticamente suscetíveis. O termo "enzima" aqui, neste requerimento de patente, se refere a qualquer proteína que catalisa a conversão de um substrato de uma forma em outra.

Outra modalidade da invenção é criar enzimas enzimaticamente suscetíveis envolvidas no reforço de ração, alimento ou combustível. Aqui, neste requerimento de patente, estas "enzimas de reforço" se referem a proteínas selecionadas entre o grupo consistindo de alfa-galactosidase, beta-galactosidase, lactases, outras fitases, beta-glucanases, em particular endo-beta-1,4-glucanases e endo-beta-1,3(4)-glucanases, celulasas, xilosidases, galactanase, em particular arabinogalactano endo-1,4-beta-galactosidases e arabinogalactano endo-1,3-beta-galactosidases, endoglucanases, em particular endo-1,2-beta-glucanase, endo-1,3-alfa-glucanase e endo-1,3-beta-glucanase, enzimas de degradação de pectina, pectinases, pectinesterases, pectina liases, poligalacturonases, arabinanases, ramnogalacturonases, ramnogalacturonano acetil esterases, ramnogalacturonano-alfa ramnosidase,

pectato liases e alfa-galacturonisidases, mananases, beta-manosidases, manano acetil esterases, xilano acetil esterases, proteases, xilanases, arabinoxilanases e enzimas lipolíticas, tais como lipases, fosfolipases, cutinases, alfa-amilase, glicoamilase, glicose isomerase, glucanase, beta-amilase, alfa-glicosidase, isoamilase, pululanase, neo-pululanase, iso-pululanase, amilopululanase, celulase, exo-1,4-beta-celobiohidrolase, exo-1,3-beta-D-glucanase, beta-glicosidase, endoglucanase, L-arabinase, alfa-arabinosidase, galactanase, galactosidase, mananase, manosidase, xilanase, xilosidase, protease, glucanase, xilanase, esterase, esterase de ácido ferrúlico, fitase e lipase.

10 Outra modalidade da invenção é uma composição de fitase enzimaticamente suscetível compreendendo adicionalmente uma quantidade eficaz de uma ou mais enzimas de reforço.

Em outra modalidade, pode ser desejável criar uma proteína com estabilidade gástrica reduzida. A estabilidade gástrica de uma proteína
15 pode ser determinada realizando uma prova de digestibilidade de fluido gástrico simulado (FSG), conforme descrito em Thomas et al., Regulatory Toxicology and Pharmacology 39:87-98(2004)) e exemplo 9 do presente requerimento. Proteínas que apresentam estabilidade gástrica são geralmente estáveis em SGF por no mínimo 10, 15, 20, 30, 60 minutos ou mais. Uma
20 proteína estável é uma proteína que não diminui de peso molecular conforme indicado visualmente sobre um gel de proteína em uma análise de SGF em que a análise de SGF foi realizada por no mínimo 10, 15, 20, 30, 60 minutos ou mais.

Outra modalidade da invenção é um método de produzir alimento humano ou ração animal compreendendo uma enzima fitase enzimaticamente suscetível. Grãos e farinhas destinados a alimentos humanos podem ser tratados enzimaticamente com uma fitase enzimaticamente suscetível para reduzir o teor de fitina do material. Os níveis reduzidos de fitina melhoram a qualidade do alimento, aumentando a disponibilidade de nutrientes minerais essenciais tais como ferro, cálcio e zinco. Além de aumentar a qualidade
30 nutricional dos alimentos, fitase enzimaticamente suscetível utilizada durante o processamento dos alimentos pode melhorar a eficiência global do método

de produção de alimentos. Por exemplo, a adição de uma fitase enzimaticamente suscetível a flocos de soja branca durante a fabricação de isolado de proteína de soja pode aumentar significativamente a produtividade e a qualidade da proteína extraível. Durante a produção de alimentos, a fitase enzimaticamente suscetível é ativa durante a fabricação e o processamento somente, e não é ativa no produto alimentar final. Este aspecto é relevante, por exemplo, no preparo e cozimento de massa. Do mesmo modo, grão de ração animal, tal como farinha de soja torrada ou farinha de canola, podem ser pré-processados com fitase enzimaticamente suscetível antes da fabricação da ração de compostos. A remoção dos fatores antinutritivos em componentes da ração animal antes da fabricação de ração de compostos produz uma qualidade nutricionalmente maior e ingrediente de ração animal mais valioso. Neste método de processamento, a fitase enzimaticamente suscetível é ativa durante a fabricação da ração, e pode ou não estar ativa no trato digestivo do animal na ingestão da ração tratada.

Outra possibilidade para a adição de fitase enzimaticamente suscetível à ração animal e alimento processado é adicionar material vegetal transgênico ou sementes contendo fitase enzimaticamente suscetível à ração. As partes das plantas as quais expressam a fitase enzimaticamente suscetível, por exemplo, a semente das plantas transgênicas ou outros materiais vegetais, tais como raízes, caules, folhas, madeira, flores, cascas e/ou frutos podem ser incluídos na ração animal, quer como tais ou depois de processamento adicional. Em uma ração ou alimento à base de cereais, o cereal é preferencialmente trigo, cevada, milho, sorgo, centeio, aveia, triticale ou arroz. A fitase enzimaticamente suscetível também pode ser usada vantajosamente em monogástricos bem como em poligástricos, especialmente bezerros jovens. Dietas para peixes e crustáceos também podem ser suplementadas com fitase enzimaticamente susceptível para aprimorar adicionalmente a proporção de conversão alimentar e reduzir o nível de fósforo excretado para sistemas de produção intensiva. A ração também pode ser fornecida a animais tais como aves, por exemplo, perus, gansos, patos, bem como suínos, equinos, bovinos, ovinos, caprinos, caninos e felinos, bem co-

mo peixes e crustáceos. A ração também pode ser fornecida a porcos ou a aves incluindo, mas não limitadas a, frangos a serem grelhados, galinhas, galinhas poedeiras, perus e patos. A ração animal pode ser usada em animais monogástricos ou poligástricos. A ração animal pode ser ração para
5 aves, ou suínos, ou bezerros, ou animais de companhia tais como cães ou gatos ou cavalos.

Outra modalidade da invenção é uma ração animal compreendendo uma fitase enzimaticamente suscetível. Um fitase enzimaticamente suscetível termotolerante é capaz de sobreviver à etapa de condicionamento
10 de calor encontrada em um moinho de peletização comercial durante a formulação da ração, deste modo é descrito um método de preparação de ração animal, por exemplo, péletes de ração granular dura compreendendo uma fitase enzimaticamente suscetível. Para produzir ração, a fitase enzimaticamente suscetível formulada pode ser misturada com componentes da
15 ração, a mistura condicionada por vapor em um moinho de peletização, de tal modo que no mínimo 50% da atividade enzimática pré-tratada com calor sejam retidos, e a ração extrusada através de um molde de pélete. A fitase enzimaticamente suscetível pode ser usada, portanto, como um suplemento em ração animal unicamente, em adição com vitaminas, minerais, outras
20 enzimas de ração, coprodutos agrícolas (por exemplo, porodutos de trigo ou farinha de glúten de milho), ou em combinação com os mesmos. A enzima também pode ser adicionada a dietas de mistura de ração de farelo ensopado, isto é, dietas que não tenham sido passadas por um peletizador.

Outra modalidade da invenção é um método para preparar ração
25 animal em que uma preparação compreendendo a fitase enzimaticamente suscetível é tratada com calor em uma temperatura superior a 50°C, de modo a produzir uma mistura de ração animal tratada termicamente. A preparação de fitase enzimaticamente suscetível pode ser material de plantas transgênicas. O material de plantas transgênicas pode ser grãos de milho, milho rachado, farinha de milho, ou um extrato enzimático, preparado a partir de milho.
30

Operações de produção animal intensiva têm por objetivo limitar a poluição de fosfato que está contida nas fezes dos animais que são produ-

zidas. A quantidade de fosfato presente na dieta e a disponibilidade do fosfato na dieta do animal são os fatores primários que influenciam o fosfato excretado presente nas fezes do animal. Atualmente, a disponibilidade da planta, ou fosfato derivado de grãos, presentes no farelo de soja, grão de milho (e outros alimentos) é baixa uma vez que o fosfato está essencialmente sob a forma de ácido fítico. De modo a maximizar a eficiência de crescimento dos animais, fosfato inorgânico é adicionado à ração, resultando em uma composição alimentar que contém níveis adequados de fosfato disponível. No entanto, estas formulações de ração contêm muito fosfato total e resultam em poluição por fosfato.

Outra modalidade da invenção é uma composição de ração animal compreendendo um fitase enzimaticamente suscetível e compreendendo adicionalmente níveis de fósforo inorgânico substancialmente reduzidos. As composições de rações compreendem ingredientes típicos de ração, micronutrientes, vitaminas, e etc., e uma quantidade eficaz da fitase enzimaticamente suscetível e fosfato inorgânico onde as quantidades da fitase enzimaticamente suscetível e do fósforo são de cerca de entre os níveis de 50 a 20.000 unidades de fitase enzimaticamente suscetível por kg de ração e menos de 0,45% de fósforo inorgânico, entre os níveis de 100 a 10.000 unidades de fitase enzimaticamente suscetível por kg de ração e menos de 0,225% de fósforo inorgânico, entre os níveis de 150 a 10.000 unidades de fitase por kg de ração e menos de 0,15% de fósforo inorgânico, ou entre os níveis de 250 a 20.000 unidades de fitase por kg de ração e nenhum fósforo inorgânico adicionado exogenamente.

Outra modalidade da invenção é um método de usar uma fitase enzimaticamente suscetível para melhorar os ganhos de peso, e proporções de conversão alimentar (FCR) associadas com a produção de animais de fazenda. Uma fitase enzimaticamente suscetível da presente invenção possibilita aprimorados ganho de peso e FCR. Métodos para melhorar o ganho de peso e a FCR também podem incluir uma dieta de baixo teor de fosfato inorgânico. O método para melhorar a FCR, ou o ganho de peso através de uma dieta de baixo teor de fosfato inorgânico, alimentando um animal com

uma dieta compreendendo uma fitase enzimaticamente suscetível e um nível de fosfato inorgânico em ou abaixo do nível de 0,45%. O método pode compreender fornecer uma dieta contendo uma fitase enzimaticamente suscetível e menos de 0,225% de fosfato inorgânico, ou o método compreende fornecer uma dieta contendo a fitase enzimaticamente suscetível e sem adição de fósforo inorgânico.

É descrito um método de melhorar o valor nutritivo de um produto de grãos processados ou um método de processamento de grãos compreendendo adicionar uma fitase enzimaticamente suscetível ao produto de grãos durante o processamento de grãos em uma quantidade eficaz para melhorar o valor nutritivo do alimento. Em uma modalidade, o grão é milho e o método de processamento de grãos é moagem a úmido e os produtos do processamento são ração de glúten de milho, glúten de milho e amido de milho. Em outras modalidades, o grão é milho, trigo, soja, canola, ou cana-de-açúcar. Em outras modalidades, o grão é uma semente oleaginosa, tal como soja ou canola ou colza, grão e o produto de grãos processado é o farelo de sementes oleaginosas.

Uma modalidade da invenção é o produto de uma célula de planta transformada compreendendo um polinucleotídeo codificando uma enzima fitase enzimaticamente suscetível. O produto pode ser uma semente, grão ou fruto. O produto pode ser uma planta, e em particular uma planta híbrida ou uma planta endógama. O produto também pode ser um produto de processamento de grãos compreendendo a fitase termotolerante da invenção, tal como o produto de processamento de grãos de milho e o produto de processamento de grãos de oleaginosas previamente descritos aqui neste requerimento de patente, ou um produto de processamento de sementes oleaginosas.

Animais, no âmbito da invenção incluem animais poligástricos, por exemplo, bezerros, assim como animais monogástricos, tais como suínos, aves domésticas (por exemplo, galinhas, perus, gansos, patos, faisão, galo silvestre, codorna e avestruz), equinos, ovinos, caprinos, caninos e felinos, bem como peixes e crustáceos. Outra modalidade da invenção inclui

ração ou ração animal preparada como ração para aves ou porcos.

Todas as publicações, patentes e requerimentos de patente são incorporados aqui, a este requerimento de patente, por meio de referência. Apesar de no relatório precedente esta invenção ter sido descrita em relação a determinadas modalidades preferenciais da mesma, e muitos detalhes terem sido determinados para fins de ilustração, será evidente para aqueles versados na técnica que a invenção é suscetível a modalidades adicionais e que alguns dos detalhes descritos aqui, neste requerimento de patente, podem ser variados consideravelmente sem se afastar dos princípios básicos da invenção.

10 Exemplos:

A invenção será adicionalmente descrita pelos seguintes exemplos, os quais não se pretende que limitem o âmbito da invenção de qualquer maneira.

Exemplo 1: Modelagem de proteína de Nov9X

15 Nov9X foi selecionada como a molécula de fitase para modelagem de proteínas. Seis estruturas cristalinas de fitase de E. coli foram resolvidas e depositadas no Research Collaboratory for Structural Bioinformation Protein Data Base (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), com PDB ID: IDKL, IDKM, IDKN, IDKO, IDKP, IDKQ. Para escolher um modelo adequado para modelagem de proteínas Nov9X, todas as estruturas cristali-
20 nas de fitase foram extraídas do PDB. A estrutura IDKM (Resolução: 2,25 Ångström) foi escolhida como o modelo para modelagem Nov9X. Cinco modelos otimizados foram criados pelo programa do software Modeler dentro do pacote Insight II da Accelrys, Inc., e foram escolhidos os modelos com o
25 menor valor de função objetiva. O modelo Nov9X escolhido foi muito similar a IDKM com somente diferença de 0,23 Ångström com respeito à espinha dorsal C-alfa RMS.

Mutações para desglicosilação, removendo potenciais pontes de dissulfeto intramolecular e introduzindo sítios de clivagem de pepsina foram
30 modeladas com a ajuda do software SwissPdb Viewer (Guex, N. and Peitsch, M.C. SWISS-MODEL e o Swiss- Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. Electrophoresis, 18, 2714-2723 (1997)) inspeção da

estrutura, análise superficial e criação de gráfico.

As alterações de aminoácidos para Nov9X para criar as variantes estão registradas nas Tabelas 1, 2, 3, 4 e 9. As posições de aminoácidos alterados são com relação à posição na proteína Nov9X descrita na SEQ ID NO: 34. A proteína Nov9X começa com o aminoácido "A". As moléculas de fitase variantes foram criadas sem o "A" e, além disso, as variantes de fitase podem começar com qualquer ou nenhum aminoácido na primeira posição. Esta variabilidade no primeiro aminoácido para as enzimas fitase variantes é resumida na listagem de sequências e denotada por um "X" no início da sequência de aminoácidos.

Exemplo 2: Design racional de variantes Nov9X: sítios de glicosilação

Dois sítios de N-glicosilação em Nov9X foram identificados computacionalmente com bem como por análise espectrométrica de massa de variantes de proteína de Nov9X expressados em *Pichia* e endosperma do milho. Estes dois sítios da proteína que foram glicosilados durante expressão em sistemas de expressão eucarióticos foram selecionados para modificação. Estes sítios de glicosilação correspondem aos resíduos aminoácidos 139-161 e resíduos aminoácidos 318-320 de Nov9X (SEQ ID NO: 34). A Tabela 1 apresenta as alterações de aminoácidos feitas nos domínios de glicosilação identificados para dar origem aos polipeptídeos descritos na SEQ ID NO: 1-3.

TABELA 1: Modificações para Nov9X à base de glicosilação

Sítio	Aminoácido prévio - posição da base - novo aminoácido	SEQ ID NO: (nome do mutante)
Glicosilação	N140Q; N318Q	1 (Mut1)
Glicosilação	T142R; N318Q	2 (Mut2)
Glicosilação	T142R; T320V	3 (Mut3)

Exemplo 3: Design racional de Nov9X variantes: pontes de dissulfeto

Resíduos cisteína específicos na fitase Nov9X foram identificados a partir da sequência de aminoácidos de Nov9X e a informação estrutural (Lim et al. *Nature*, 7(2) 108-113(2000)). Resíduos cisteína participando em pontes de dissulfeto intramoleculares foram direcionados para alteração. Além disso, resíduos cisteína potencialmente participando em pontes de dis-

sulfeto intermoleculares foram direcionados para alteração. Alterações na formação de pontes de dissulfeto foram mapeadas sobre o modelo tridimensional da proteína para evita fazer alterações para a estrutura global e a capacidade da proteína para dobrar na conformação correta. Aminoácidos cisteína em Nov9X foram alterados para gerar as sequências descritas na SEQ ID NO: 4-14. As alterações de aminoácidos específicas estão resumidas na Tabela 2.

TABELA 2: Modificação para Nov9X com base em pontes de dissulfeto

Domínio	Aminoácido prévio - posição da base - novo aminoácido	SEQ ID NO: (nome do mutante)
Cisteína	C76K; C205N	4 (Mut4)
Cisteína	C76K; C205N; C179A; C189A	5 (Mut5)
Cisteína	C76K; C205N; C383A; C392A	6 (Mut6)
Cisteína	C76K; C205N; C179A; C189A; C383A; C392A	7 (Mut7)
Cisteína	C76K; C205N; C78A; C109A	8 (Mut8)
Cisteína	C76K; C205N; C134A; C409A	9 (Mut9)
Cisteína	A26F, C76V, T115H, N138E, T142R, E147R, G158R, C205D, V212W, Q254V, R268A, T328Y, C179A, C189A	10 (Mut10)
Cisteína	A26F, C76V, T115H, N138E, T142R, E147R, G158R, C205D, V212W, Q254V, R268A, T328Y, C383A, C392A	11 (Mut11)
Cisteína	A26F, C76V, T115H, N138E, T142R, E147R, G158R, C205D, V212W, Q254V, R268A, T328Y, C179A, C189A, C383A, C392A	12 (Mut12)
Cisteína	A26F, C76V, T115H, N138E, T142R, E147R, G158R, C205D, V212W, Q254V, R268A, T328Y, C78A, C109A	13 (Mut13)
Cisteína	A26F, C76V, T115H, N138E, T142R, E147R, G158R, C205D, V212W, Q254V,	14 (Mut14)

	R268A, T328Y, C134A, C409A	
--	----------------------------	--

Exemplo 4: Design racional de Nov9X variantes: sítios de clivagem de pepsina potenciais

O modelo de estrutura tridimensional de Nov9X foi analisado para identificar laços na estrutura da proteína que eram candidatos para engenharia com um ou mais sítios de clivagem de pepsina potenciais. Os laços particulares identificados para modificação tiveram de satisfazer vários critérios incluindo: 1) o laço não estava enterrado dentro da estrutura tridimensional da proteína, 2) o laço estava sobre a superfície da proteína e, portanto, exposto ao meio circundante e acessível a proteases quanto a proteína foi dobrada corretamente, 3) o laço não estava envolvido na formação do sítio ativo ou substrato ou sítio de ligação de produto da enzima, e 4) o laço continha uma sequência de aminoácidos similar a um sítio de clivagem de pepsina favorável de modo a facilitar fazer uma alteração menor na sequência de aminoácidos (um ou dois resíduos alterados) de modo a introduzir sítios de clivagem de pepsina favoráveis dentro do laço.

Esta abordagem não altera a extensão dos laços e mantém as mutações em um nível mínimo de modo a evitar a perturbação da estrutura local e global da proteína dobrada. Foram identificados vários laços de proteína que satisfazem os critérios acima e estes laços correspondem aos seguintes resíduos aminoácidos em Nov9X (SEQ ID NO:34), 33-46, 105-137, 172-177, 229-240, 281-293, 316-330, e 364-373. Sítios de clivagem de pepsina potenciais dentro de um ou mais destes laços foram produzidos para conter uma sequência de aminoácidos que se sabe que é mais prontamente atacada pela enzima pepsina. As enzimas fitase enzimaticamente suscetíveis estão resumidas na Tabela 3 e correspondem às sequências de aminoácidos descritas na SEQ ID NO:15-25.

TABELA 3: Modificações para Nov9X com base em sítios de clivagem de protease potenciais

Sítio	Aminoácido prévio - posição da base - novo aminoácido	SEQ ID NO: (nome do mutante)
Sítio de clivagem de pepsina	W37F; P38Y	15 (Pep1)

Sítio de clivagem de pepsina	P124E; P127L	16 (Pep2)
------------------------------	--------------	-----------

TABELA 3: -continuação-

Sítio	Aminoácido prévio - posição da base - novo aminoácido	SEQ ID NO: (nome do mutante)
Sítio de clivagem de pepsina	N126Y; P127V	17 (Pep3)
Sítio de clivagem de pepsina	P174Y	18 (Pep4)
Sítio de clivagem de pepsina	G233E; G235Y	19 (Pep5)
Sítio de clivagem de pepsina	K286F; Q287Y	20 (Pep6)
Sítio de clivagem de pepsina	N317L; W318Y	21 (Pep7)
Sítio de clivagem de pepsina	S367F	22 (Pep8)
Sítio de clivagem de pepsina	W37F; P38Y; P124E; P127L	23 (Pep9)
Sítio de clivagem de pepsina	W37F; P38Y; N126Y; P127V	24 (Pep10)
Sítio de clivagem de pepsina	P174Y; N317L; W318Y	25 (Pep11)

Exemplo 5: Design racional de mutantes Nov9X: inserção de sítios de clivagem de pepsina altamente favoráveis.

- Os laços de proteína identificados no Exemplo 4 foram modificados por inserção ou substituição da sequência de laço inteiramente. A sequência de laço foi substituída com a sequência de uma sequência de sítio de clivagem de pepsina altamente favorável (Keil B., Specificity of Proteolysis. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York p.335 (1992)). As modificações para a proteína Nov9X foram moderadas devido à inserção de uma sequência inteiramente nova que tinha vários aminoácidos de extensão. A Tabela 4 resume das modificações de aminoácidos feitas para Nov9X e correspondem às sequências de aminoácidos descritas na SEQ ID NO: 26-33.

TABELA 4: Modificações em Nov9X com base em sítios de ligação de pepsina de alta afinidade

Sítio	Aminoácido prévio - posição da base - novo aminoácido	SEQ ID NO: (nome do mutante)
Sítio de Inserção	DAWPTW 36-41 IIEFFRL	26 (Pep41)
Sítio de Inserção	DADTSSP 116-122 PTEFFRL	27 (Pep42)
Sítio de Inserção	PDPLFNP 122-128 PIEFFRL	28 (Pep43)

Sítio de Inserção	PQ 174-175 PIEFFRLQ	29 (Pep44)
-------------------	---------------------	------------

TABELA 4: -continuação-

Sítio	Aminoácido prévio - posição da base - novo aminoácido	SEQ ID NO: (nome do mutante)
Sítio de Inserção	EPGWGRI 232-238 PIEFFRL	30 (Pep45)
Sítio de Inserção	PPQKQAY 284-290 PPEFFRL	31 (Pep46)
Sítio de Inserção	WTLPGQP 319-325 PIEFFRL	32 (Pep47)
Sítio de Inserção	TPLSLNT 365-371 PPEFFRL	33 (Pep48)

Exemplo 6: Otimização por códon de variantes para expressão bacteriana

A sequência de proteínas da enzima fitase enzimaticamente suscetível foi convertida em uma sequência de polinucleotídeos. A sequência de polinucleotídeos foi modificada de modo que o códon usado para translação nos aminoácidos refletiu o códon ótimo usado em *E. coli*.

As sequências de polinucleotídeos otimizadas por *E. coli* conforme descrito na SEQ ID NO: 35-67 foram sintetizadas e subclonadas em vetor de expressão de *E. coli* pFLEX HX pela GeneArt, Regensburg, Alemanha. O vetor final continha um cassete de expressão que incluiu a sequência de polinucleotídeos códon otimizada para a fitase enzimaticamente suscetível encadeada a uma sequência que adicionou uma etiqueta de histidina (His-tag) N-terminal. Para facilidade de referência, a Tabela 5 resume a relação entre sequências de polipeptídeos e de polinucleotídeos contidas na Listagem de Sequência.

Tabela 5: Sequências de polinucleotídeos e sequências de polipeptídeos códon otimizadas

Sequência de polipeptídeo SEQ ID NO: (nome mutante)	Sequência de polinucleotídeo otimizado por códon de <i>E. coli</i> correspondente (SEQ ID NO:)	Sequência de polinucleotídeo otimizado por planta correspondente (SEQ ID NO:)
1 (Mut1)	35	70
2 (Mut2)	36	71
3 (Mut3)	37	72
4 (Mut4)	38	73
5 (Mut5)	39	74

Tabela 5: -continuação-

Sequência de polipeptídeo SEQ ID NO: (nome mutante)	Sequência de polinucleotídeo otimizado por códon de E. coli correspondente (SEQ ID NO:)	Sequência de polinucleotídeo otimizado por planta correspondente (SEQ ID NO:)
6 (Mut6)	40	75
7 (Mut7)	41	76
8 (Mut8)	42	77
9 (Mut9)	43	78
10 (Mut10)	55	90
11 (Mut11)	56	91
12 (Mut12)	57	92
13 (Mut13)	58	93
14 (Mut14)	59	94
15 (Pep1)	44	79
16 (Pep2)	45	80
17 (Pep3)	46	81
18 (Pep4)	47	82
19 (Pep5)	48	83
20 (Pep6)	49	84
21 (Pep7)	50	85
22 (Pep8)	51	86
23 (Pep9)	52	87
24 (Pep10)	53	88
25 (Pep11)	54	89
26 (Pep41)	60	95
27 (Pep42)	61	96
28 (Pep43)	62	97
29 (Pep44)	63	98
30 (Pep45)	64	99
31 (Pep46)	65	100
32 (Pep47)	66	101

Tabela 5: -continuação-

Sequência de polipeptídeo SEQ ID NO: (nome mutante)	Sequência de polinucleotídeo otimizado por códon de E. coli correspondente (SEQ ID NO:)	Sequência de polinucleotídeo otimizado por planta correspondente (SEQ ID NO:)
33 (Pep48)	67	102
103 (Mut 15)	124	145
104 (Mut 17)	125	146
105 (Mut 18)	126	147
106 (Mut 19)	127	148
107 (Mut 20)	128	149
108 (Mut 21)	129	150
109 (Mut 22)	130	151
110 (Mut 23)	131	152
111 (Mut 24)	132	153
112 (Mut 25)	133	154
113 (Mut 26)	134	155
114 (Mut 27)	135	156
115 (Mut 28)	136	157
116 (Mut 29)	137	158
117 (Mut 30)	138	159
118 (Mut 31)	139	160
119 (Mut 32)	140	161
120 (Mut 33)	141	162
121 (Mut 34)	142	163
122 (Mut 35)	143	164
123 (Mut 36)	144	165

Exemplo 7: Construção de Vetor para Expressão Bacteriana

Os cassetes de expressão otimizados por códons bacterianos descritos no Exemplo 6 foram clonados no vetor de expressão pET24a (Invitrogen).

5

Cassetes de expressão contendo as sequências de polinucleotí-

deos descritas nas SEQ ID NO: 35, 36, e 38 foram clonados como fragmentos NdeI / XhoI.

Cassetes de expressão contendo as sequências de polinucleotídeos descritas nas SEQ ID NO: 37, 39-43, e 59 foram clonados como fragmentos NdeI/ NotI.

As digestões de restrição para gerar o vetor e fragmentos de inserto foram realizados seguindo protocolos de rotina (Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York (1989)). Os produtos das digestões foram separados por eletroforese por gel sobre um gel agarose a 0,8%, e as bandas corretas foram cortadas do gel e purificadas usando o kit *Gene clean spin* da Qbiogene. Os fragmentos de insertos purificados e de vetores foram então ligados juntos usando ou Clonables ligase da Novagen, ou a T4 DNA ligase da Epicentre Biotechnologies, seguindo os protocolos dos fabricantes. Os vetores ligados foram então transformados em células TOP 10 de E. coli da Invitrogen seguindo o protocolo prescrito pelo fabricante, e selecionados sobre lâminas de agar Luria + canamicina (50 µg/ml).

Colônias as quais cresce, sobre lâminas foram triadas por PCR de colônia com iniciador dianteiro descrito na SEQ ID NO: 68 e iniciador reverso descrito na SEQ ID NO: 69 para confirmar a presença do plasmídeo correto. Os PCR's foram ajustados como se segue: 2,8 pmol de cada iniciador, 2x mistura de PCR Jumpstart da Sigma, colônia de E. coli como modelo e água para um volume de reação final de 5 µl. Foram usadas as seguintes condições de ciclagem: uma desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos seguida por 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos, seguida por uma etapa de extensão final de 72°C por 10 minutos. Colônias com os plasmídeos desejados foram então cultivadas de um dia para o outro em caldo Luria + canamicina (50 µg/ml) a 37°C, 260 rpm, e o DNA de plasmídeo foi extraído usando o kit Qiagen miniprep. O gene inserido no DNA de plasmídeo resultante foi sequenciado para confirmar totalmente que o constructo correto tinha sido produzido.

Os cassetes de expressão contendo as fitases enzimaticamente

suscetíveis cuja sequência de polinucleotídeos é descrita na SEQ ID NO: 44-54 foram clonados como fragmentos BsgI/ Ascl em vetor pFLEXHX T7. pFLEXHX T7 foi gerado substituindo o promotor pFLEX HX com o promotor T7 de pET24a usando técnicas de biologia molecular de rotina.

5 Exemplo 8: Método de Isolar Proteínas a partir de Bactérias

Os vetores pET24 e os vetores pFLEXHX T7 contendo os cassetes de expressão contendo as sequências de polinucleotídeos conforme descrito no Exemplo 7, foram transformados em células de E. coli BL21[DE3] (Invitrogen). Alíquotas de 10 ml de meio LB contendo canamicina (50 µg/ml) (Sigma) foram inoculadas com uma colônia das lâminas de transformação e incubadas de um dia para o outro com agitação a 30°C. 5 a 10 ml destas culturas foram transferidas para alíquotas de 500 ml de meio LB contendo canamicina a 50 µg/ml em frascos de agitação de 1 litro. Os frascos foram incubados a 37°C com agitação até ser obtida uma OD₆₀₀ de aproximada-
mente 0,6. Os frascos de agitação foram transferidos para uma incubadora a 15°C. IPTG (Sigma) foi adicionado para dar uma concentração final de 0,1 mM, e os frascos foram incubados de um dia para o outro com agitação. A biomassa celular foi colhida por centrifugação a 24.000 Xg por 15 minutos. A densidade celular na colheita foi na faixa de 2,5 a 3,5 OD₆₀₀. A biomassa celular foi congelada a -20°C.

As amostras de biomassa celular foram degeladas e ressuspensas em 50 ml de tampão de extração (20 mM de Tris, 25 mM de Imidazol, 500 mM de NaCl, pH 7,5). As células foram lisadas passando a suspensão através de um disruptor celular Constant Systems a 25.000 psi, e a amostra foi jateada direto com 25 ml de tampão de extração. O material insolúvel foi removido por centrifugação a 24.000 Xg por 30 minutos, seguida por filtração através de dispositivos de filtro a vácuo de 0,22 µm (Millipore Steritop). Os lisados clarificados foram mantidos sobre gelo.

Uma coluna de 5 ml HisTrap FF (GE Healthcare, resina Ni-Sepharose FF, diâmetro de leito de 1,6 cm) foi equilibrada com tampão de extração. 43 ml das amostras de lisado clarificado foram carregados a 4 ml/min. O material não ligado foi lavado através da coluna com tampão de

extração a 4 ml/min. Proteínas purificadas por afinidade foram elutriadas com tampão de elutriação (20 mM de Tris, 500 mM de Imidazol, 500 mM de NaCl, pH 7,5) a 4 ml/min e o pico de elutriação de A₂₈₀ nm foi coletado. As elutriações coletadas foram permutadas por tampão em 20 mM de Tris pH 7,5 usando concentradores centrífugos MWCO de 10 kDa (Millpore Amicon Ultra- 15) e concentradas até aproximadamente 3 ml nos mesmos dispositivos. As amostras foram centrifugadas a 3700 Xg por 10 minutos para remover qualquer precipitado. As concentrações de proteína foram estimadas por A₂₈₀ nm usando os coeficientes de extinção específicos. As concentrações foram na faixa de 4 a 15 mg/ml e as produções foram tipicamente de 15 a 30 mg a partir de 500 ml de cultura. As amostras foram armazenadas a -80°C.

Exemplo 9: Estabilidade em fluido gástrico simulado (SGF)

A digestibilidade de amostras de proteína em fluido gástrico simulado foi realizada basicamente conforme descrito em Thomas et al., Regulatory Toxicology and Pharmacology 39:87-98 (2004)). Cada proteína de teste foi purificada conforme descrito no Exemplo 8. A concentração de proteína de cada amostra foi determinada usando o kit BCA de Pierces.

A solução G-Con foi preparada de acordo com o seguinte protocolo: 200 mg de cloreto de sódio foram dissolvidos em 90 ml de água milli-Q com misturação. Esta solução foi titulada para pH 1,2 usando 6 N de HCl e água milli-Q foi adicionada para um volume final de 100 ml.

Fluido Gástrico Simulado com pepsina (IX SGF) foi preparado para cada proteína de teste para dar 10 unidades de pepsina por 1 g de proteína de teste nas soluções da reação. Deste modo, foi usada uma proporção de 10 U de atividade de pepsina /1 g de proteína de teste do início ao fim do estudo. Pepsina foi adquirida da Sigma Chemical (St. Louis, MO) em um único lote tendo 3460 U/mg de proteína conforme analisado pela Sigma. O NaHCO₃ a 200 mM foi preparado com 1,68 g de NaHCO₃ em 100 ml de água milli-Q e titulado com HCl para um pH de 11,0.

Cada proteína de teste foi incubada em três misturas de reações diferentes por 60 minutos a 37°C sobre uma placa quente. Cada tubo contendo G-Con ou SGF foi incubado a 37°C por 2 minutos antes de adicionar a

proteína de teste. As misturas das reações foram preparadas como se segue:

- Mistura de Reação 1: volume total de 400 µl, contendo SGF (pepsina em proporção de 10 unidades de pepsina por 1 µg de proteína de teste em G-Con) e solução de proteína de teste

5 ▪ Mistura de Reação 2: volume total de 150 µl, contendo G-Con (HCl diluído, 100 mM de NaCl) em pH 1,2 e solução de proteína de teste (0,135 mg/ml de concentração final); esta é uma amostra controle para estabilidade da proteína de teste em tampão de reação sem pepsina

10 ▪ Mistura de Reação 3: 150 µl de SGF e água; esta é algumas amostras controle para autodigestão por pepsina (pepsina sem proteína de teste)

Amostras de 50 µl foram removidas das misturas das reações 1 e 3 (controles) em 0 e 60 minutos, e da mistura da reação 2 (teste) em 0,5, 2, 5, 10, 20, 30, e 60 minutos. Cada uma destas amostras foi transferida para
15 uma solução de parada contendo 35 µl de tanto 200 mM de NaHCO₃ (pH 11,0) quanto 4X tampão de carga Bio-Rad XT. As amostras de digestão de proteína do ponto de tempo zero foram preparadas extinguindo a pepsina na solução antes de adicionar a proteína de teste. Todas as amostras foram incubadas por 5 minutos em um banho de água a 70°C para parar a reação
20 e em seguida analisadas usando SDS-PAGE. 20 µl de cada amostra foram analisados sobre 4 a 12% de um gel Bis-Tris (Biorad) em tampão de operação XT MOPS (Biorad). A quantidade total de proteína carregada por alameda foi 1,9 µg. Padrão precolorado SeeBlue Plus2 Prestained Standard (Invitrogen) foi usado como o marcador de peso molecular. Depois de eletroforese,
25 os géis foram corados com SimplyBlue SafeStain (Invitrogen). Amostras de digestão foram analisadas inspecionando visualmente bandas de proteína coradas depois da eletroforese.

A estabilidade em fluido gástrico simulado para as variantes de fitase enzimaticamente suscetível geradas é resumida na Tabela 6. A estabilidade em SGF de cada proteína é indicada como a extensão de tempo (em minutos) que a proteína ou seu um ou mais fragmentos peptídicos são detectáveis visualmente por tingimento do gel depois de SDS-PAGE.

30

Tabela 6: Estabilidade em fluido gástrico simulado (SGF) de enzimas fitase enzimaticamente suscetíveis.

Variante	Estabilidade em SGF (minutos)	Presença de polímeros
Mut1	60+	Sim
Mut2	60+	Sim
Mut3	60+	Sim
Mut4	60+	Não
Mut5	<20	Não
Mut6	60+	Não
Mut7	<20	Não
Mut8	60+	Não
Mut9	<5	Não
Pep1	<10	Sim
Pep2	<10	Sim
Pep3	<10	Sim
Pep4	60+	Sim
Pep5	<30	Sim
Pep6	60+	Sim
Pep7	<30	Sim
Pep8	<30	Sim
Pep9	<20	Sim
Pep10	<2	Sim
Pep11	<30	Sim

Há informação conflitante disponível com relação a se enzimas fitase funcionam como proteínas monoméricas ou se funcionam como mul-

5 tímeros. Fitases isoladas a partir de *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, *Emericella nidulas*, *Afyceliophtkora thermophila* e *Talaromyces thermophilus* (Wyss et al. Appl. And Envior. Micro. 65:359-366 (1999)) funcionam como proteínas monoméricas. Além disso, fitases de sementes de soja (Gibson et al. Arch. Biochem. Biophys. 260:503-513 (1988)), *E. coli*

10 e *Klebsiella terrigena* (Greiner, et al. Arch. Biochem. Biophys. 303:107-113

(1993); Greiner, et al. Arch. Biochem. Biophys. 341:201-206 (1997)), e *Bacillus subtilis* (Schimizu, Biosci. Biotechnol. Biochem. 56:1266-1269 (1992)) parecem ser monoméricas. Evidência para formação de multímeros em fitases de *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae*, *Schwanniomyces castellii* foi demonstrada por Hubel, et al. Plant Physiol 112:1429-1436 (1996); Segueilha, et al. J. Ferment. Bioeng. 74:7-11 (1992); Schimizu Biosci. Biotechnol. Biochem, 57:1364-1365 (1993) e Yamamoto et al. Agric. Biol. Chem. 36:2097-2103.

A formação de multímero da fitase enzimaticamente suscetível foi observada na análise SDS-PAGE da prova de fluido gástrico simulado (SGF). Não foram observados multímeros na prova de SGF nas variantes de cisteína descritas na SEQ ID NO: 4-9.

Exemplo 10: Atividade de fitase das proteínas mutantes sobre uma faixa de pH

Provas de atividade de fitase foram realizadas seguindo o método de teste descrito por Engelen et al. Journal of AOAC Int. 77(3):760-764 (1994). Enzima (Nov9X ou as variantes de fitase enzimaticamente suscetível em faixas de concentrações de 0,5 a 10 mg/ml) foi diluída 10000 a 50000 vezes em água antes da prova em diferentes pH. Soluções tampão com substrato de fitato foram preparadas como se segue:

Tampão de Glicina-HCl - 100 mM de glicina contendo 3 mM de ácido fítico foi usada para valores de pH de 2,0, 2,5, 3,0, e 3,5.

Tampão de Acetato - 100 mM de acetato contendo 3 mM de ácido fítico foi usado para valores de pH de 4,0, 4,5, 5,0, e 5,5.

Tampão Mes - 100 mM de Mes contendo 3 mM de ácido fítico foi usado para valores de pH de 6, 6,5, e 7,0.

Reações de teste em diferentes pHs foram realizadas em duplicata com 300 µl de tampão com 150 µl de substrato de fitato de diluído. As incubações, por 10 e 20 minutos, foram realizadas a 37°C seguidas por extinção simultânea e detecção colorimétrica. O produto de fosfato inorgânico gerou complexos com íons molibdato e vanadato resultando em uma formação de cor. A absorvência do ácido vanadomolibdofosfórico de cor amarela, cuja concentração é proporcional à concentração de íons de fosfato na mistura da reação, foi medida em um comprimento de onda de 415 nm. A ab-

sorvência medida foi usada para determinar a concentração de íons de fosfato por comparação com uma curva de calibração de fosfato padrão.

- 5 Atividade relativa de fitase em pH 4,5 a 37°C na presença de 3 mM de fitato é resumida na Tabela 7. A atividade relativa é expressada como uma percentagem da atividade de Nov9X. A atividade relativa de fitase em pH 2,5 a 27°C na presença de 3 mM de fitato é resumida na Tabela 7. A atividade relativa é expressada como uma percentagem da atividade de Nov9X em pH 4,5.

Tabela 7: Atividade relativa de variantes de fitase enzimaticamente suscetíveis

Variante	Atividade relativa em pH 4,5	Atividade relativa em pH 2,5
Mut1	142,0	84,7
Mut2	33,7	ND
Mut3	60,1	ND
Mut4	175,7	105,0
Mut5	161,7	97,4
Mut6	173,3	ND
Mut7	176,9	102,0
Mut8	184,4	ND
Mut9	176,9	110,7
Pep1	64,5	38,9
Pep2	60,0	ND
Pep3	55,2	30,0
Pep4	161,8	83,8
Pep5	121,4	68,8
Pep6	66,7	ND
Pep7	138,3	110,7
Pep8	195,3	120,5
Pep9	122,5	52,6
Pep10	13,5	ND
Pep11	100,2	67,4

- 10 ND: dados não gerados

Exemplo 11: Comparação da termotolerância das proteínas mutantes

Proteína de teste foi diluída em 100 mM de tampão de acetato (pH 4,5), contendo 0,01% de Tween 20, antes de tratamento com calor. 100 µl de cada solução de enzima diluída foi tratada com calor usando um Gradient PCR Cycler em 40 a 95 °C (incrementos de 5°C por incubação) por 5 minutos. As enzimas do choque térmico foram imediatamente colocadas e mantidas em condições resfriadas até ser feita diluição da prova. A atividade de fitase residual na fração enzimática tratada com calor foi estimada usando prova de fitase padronizada depois de diluição de 10.000 a 50.000 vezes em 100 mM de tampão de acetato (pH 4,5), contendo 3 mM de substrato de fitato e 0,01% de Tween 20. A mistura da reação de fitase foi incubada a 37 °C por 15 a 40 minutos. A prova de cada fração tratada com calor foi feita em duplicata em bloco de 96 poços profundos e a quantidade de fosfato inorgânico liberado foi estimada por comparação da absorvência das reações colorométricas com a curva de fosfato padrão. A atividade de fitase residual foi calculada por comparação com a atividade observada na fração de enzima não tratada.

A termotolerância relativa das enzimas fitase enzimaticamente suscetíveis foi determinada a partir de um gráfico da atividade de fitase residual versus temperatura de pré-tratamento. Os valores mostrados na Tabela 8 representam a temperatura na qual 5 minutos de tratamento térmico resultarão em 50% de perda de atividade de fitase comparada com enzima não tratada.

Tabela 8: Termotolerância relativa de fitase termotolerante enzimaticamente suscetível

Variante	Temperatura
Mut1	68
Mut2	68
Mut3	63
Mut4	70
Mut5	68
Mut6	68

Tabela 8: -continuação-

Variante	Temperatura
Mut7	66,5
Mut8	68
Mut9	63
Pep1	70
Pep2	70
Pep3	70
Pep4	68
Pep5	65
Pep6	ND
Pep7	68
Pep8	68
Pep9	66,5
Pep10	ND
Pep11	70

ND: dados não gerados

Exemplo 12: Combinações de mutações

Com base nos dados gerados nos Exemplos 9 a 11, foram selecionadas para análise combinações específicas de variantes. Estas combinações estão descritas na Tabela 9. Sequências de polinucleotídeos códon otimizadas para expressão bacteriana foram geradas para codificar as variantes de polipeptídeos descritas na Tabela 9 essencialmente conforme descrito no Exemplo 6. As sequências de polinucleotídeos códon otimizadas bacterianas foram em seguida incorporadas em um vetor de expressão bacteriana essencialmente conforme descrito no Exemplo 7 e as proteínas fitase enzimaticamente suscetíveis purificadas essencialmente conforme descrito no Exemplo 8. Sequências de polinucleotídeos códon otimizadas e sequências de polipeptídeos mutantes de combinações correspondentes são referidas na Tabela 5 para resumir a relação entre sequências de polipeptídeos e polinucleotídeos contidas na Listagem de Sequências.

Tabela 9: Combinações de variantes de fitase enzimaticamente suscetíveis

Nome do mutante (SEQ ID NO:)	Aminoácidos prévios – posições das bases - novos aminoácidos	Mutantes combinados
mut15 (103)	C76K, N140Q, C205N, N318Q	mut1, mut4
mut17 (104)	W38F, P39Y, C76K, N140Q, C205N, N318Q	mut1, mut4, Pep1
mut18 (105)	W38F, P39Y, C76K, N140Q, C205N, N318L, W319Y	mut1, mut4, Pep1, Pep7
mut19 (106)	W38F, P39Y, C76K, N140Q, C205N, N318Q, S368F	mut1, mut4, Pep1, Pep8
mut20 (107)	C76K, N140Q, C205N, N318L, W319Y	mut1, mut4, Pep7
mut21 (108)	C76K, N140Q, C205N, N318Q, S368F	mut1, mut4, Pep8
mut22 (109)	C76K, P124E, P128L, N140Q, C205N, N318L, W319Y	mut1, mut4, Pep2, Pep7
mut23 (110)	C76K, N127Y, P128V, N140Q, C205N, N318Q, S368F	mut1, mut4, Pep3, Pep8
mut24 (111)	A26F, C76K, N138V, N140Q, C205N, V212W, N318Q	mut1, mut4
mut25 (112)	A26F, W38F, P39Y, C76K, N138V, N140Q, C205N, V212W, N318Q	mut1, mut4, Pep1
mut26 (113)	A26F, C76K, P124E, P128L, N138V, N140Q, C205N, V212W, N318Q	mut1, mut4, Pep2
mut27 (114)	A26F, C76K, N127Y, P128V, N138V, N140Q, C205N, V212W, N318Q	mut1, mut4, Pep3
mut28 (115)	A26F, W38F, P39Y, C76K, N138V, N140Q, C205N, V212W, N318L, W319Y	mut1, mut4, Pep1, Pep7

Tabela 9: -continuação-

Nome do mutante (SEQ ID NO:)	Aminoácidos prévios – posições das bases - novos aminoácidos	Mutantes combinados
mut29 (116)	A26F, W38F, P39Y, C76K, N138V, N140Q, C205N, V212W, N318Q, S368F	mut1, mut4, Pep1, Pep8
mut30 (117)	A26F, C76K, P124E, P128L, N138V, N140Q, C205N, V212W, N318L, W317Y	mut1, mut4, Pep2, Pep7
mut31 (118)	A26F, C76K, N127Y, P128V, N138V, N140Q, C205N, V212W, N318Q, S368F	mut1, mut4, Pep3, Pep8
mut32 (119)	A26F, C76K, N138W, N140Q, C205N, C179A, C189A, V212W, N318Q	mut1, mut5
mut33 (120)	A26F, W38F, P39Y, C76K, N138W, N140Q, C205N, C179A, C189A, V212W, N318L, W319Y	mut1, mut5, Pep1, Pep7
mut34 (121)	A26F, W38F, P39Y, C76K, N138V, N140Q, C205N, C179A, C189A, V212W, N318L, S368F	mut1, mut5, Pep1, Pep8
mut35 (122)	A26F, C76K, C134A, N138V, N140Q, C205N, V212W, N318Q, C409A	mut1, mut9
mut36 (123)	A26F, W38F, P39Y, C76K, C134A, N138V, N140Q, C205N, V212W, N318Q, S368F, C409A	mut1, mut9, P2p1, Pep8

Exemplo 13: Estabilidade de variantes de fitase de combinações em fluido gástrico simulado (SGF)

Proteínas purificadas de variantes de fitase de combinações foram analisadas para sensibilidade a pepsina essencialmente conforme descrito no Exemplo 9. A estabilidade em SGF é resumida na Tabela 10

Tabela 10: Estabilidade em SGF de variantes de fitase de combinações

Variante	Estabilidade em SGF (minutos)	Presença de polímeros
mut15 (103)	60+	Não
mut17 (104)	<10	Não
mut18 (105)	<5	Não
mut19 (106)	<5	Não
mut20 (107)	<40	Não
mut21 (108)	<40	Não
mut22 (109)	<10	Não
mut23 (110)	<10	Não
mut24 (111)	60+	Não
mut25 (112)	<30	Não
mut26 (113)	60+	Não
mut27 (114)	60+	Não
mut28 (115)	60+	Não
mut29 (116)	<30	Não
mut30 (117)	60+	Não
mut31 (118)	60+	Não
mut32 (119)	60+	Não
mut33 (120)	<10	Não
mut34 (121)	<10	Não
mut35 (122)	<40	Não
mut36 (123)	<10	Não

ND: dados não gerados

Exemplo 14: Atividade de fitase relativa de variantes de combinações em pH 4,5

- 5 Proteínas purificadas a partir de variantes de fitase de combinações foram analisadas para atividade em pH 4,15 essencialmente conforme descrito no exemplo 10. Os resultados da atividade relativa para as variantes de fitase de combinações em pH 4,5 estão resumidos na Tabela 11.

Tabela 11: Atividade de fitase relativa de variantes de combinações em pH 4,5

Variante	Atividade relativa em pH 4,5
mut15 (103)	327,9
mut17 (104)	126,8
mut18 (105)	182,3
mut19 (106)	189,2
mut20 (107)	ND
mut21 (108)	ND
mut22 (109)	ND
mut23 (110)	81,5
mut24 (111)	277,4
mut25 (112)	ND
mut26 (113)	ND
mut27 (114)	ND
mut28 (115)	ND
mut29 (116)	243
mut30 (117)	ND
mut31 (118)	ND
mut32 (119)	307,6
mut33 (120)	263,3
mut34 (121)	280,6
mut35 (122)	ND
mut36 (123)	ND

ND: dados não gerados

Exemplo 15: Termotolerância de variantes de fitase de combinações

- 5 Proteínas purificadas a partir de variantes de fitase de combinações foram analisadas para termotolerância essencialmente conforme descrito no exemplo 11. Dados de termotolerance para as variantes de fitase de combinações estão resumidos na Tabela 12. Os valores mostrados na Tabela 11 re-

presentam a temperatura na qual 5 minutos de tratamento térmico resultarão em 50% de perda de atividade de fitase comparada com enzima não tratada.

Tabela 12: Termotolerância relativa de combinação de variantes de fitase

Variante	Temperatura
mut15 (103)	72
mut17 (104)	68
mut18 (105)	63
mut19 (106)	63
mut20 (107)	ND
mut21 (108)	ND
mut22 (109)	59
mut23 (110)	63
mut24 (111)	70
mut25 (112)	73
mut26 (113)	ND
mut27 (114)	68
mut28 (115)	ND
mut29 (116)	69
mut30 (117)	ND
mut31 (118)	ND
mut32 (119)	72
mut33 (120)	64
mut34 (121)	64
mut35 (122)	68
mut36 (123)	58

ND: dados não gerados

5 **Exemplo 16:** Otimização por códons de variantes para expressão em plantas

A sequência de proteína da enzima fitase enzimaticamente suscetível é convertida em uma sequência de polinucleotídeos. A sequência de polinucleotídeos é modificada de modo que o códon reflete o códon ótimo

em milho.

As sequências de polinucleotídeos otimizadas por milho conforme descrito na SEQ ID NO: 70-102 são sintetizadas e subclonadas em vetor de expressão de *E. coli* pFLEX HX pela GeneArt, Regensburg, Alemanha. O

5 vetor final contém um cassete de expressão que inclui a sequência de polinucleotídeos otimizada por códons para a fitase enzimaticamente suscetível encadeada a uma sequência que adicionada uma etiqueta de histidina (His-tag) N-terminal. Para facilidade de referência, a Tabela 5 resume a relação

10 entre sequências de polipeptídeos e de polinucleotídeos que estão na Lista-gem de Sequências.

Exemplo 17: Método de produzir um vetor de transformação vegetal e criar plantas transgênicas.

Vetores binários para transformação de milho são construídos em duas etapas. Na primeira etapa, três fragmentos são fundidos para gerar

15 um cassete de expressão. O cassete de expressão consiste em um cassete promotor de glutelina do arroz HindIII-BamHI fundido a um cassete BamHI-SacI (contendo o gene de interesse) incluindo uma sequência de retenção SEKDEL ER. Este cassete é então fundido a um cassete terminador SacI-KpnI CMV 35s. O cassete terminador inclui um íntron PEPC invertido. O

20 cassete de expressão é então transferido como um fragmento HindIII-KpnI para o vetor binário pNOV2117, o qual contém o gene de fosfomanose isomerase (PMI) possibilitando seleção de células transgênicas com manose.

A transformação de embriões de milho imaturos é realizada essencialmente conforme descrito em Negrotto et al., Plant Cell Reports 19:798-803

25 (2000). Vários constituintes de meios descritos no mesmo podem ser substituídos.

Agrobacterium cepa LBA4404 (Invitrogen) contendo o plasmídeo de transformação vegetal é cultivado sobre meio sólido YEP (extrato de levedura (5 g/L), peptona (10g/L), NaCl (5 g/L), 15 g/l de ágar, pH 6,8) por 2 a 4

30 dias a 28°C. Aproximadamente $0,8 \times 10^9$ Agrobactérias são suspensas em meio LS-inf suplementado com 100 µM de acetossiringona (As) (meio LSAs) (Negrotto et al., Plant Cell Rep 19:798-803 (2000)). Bactérias são pré-induzidas

neste meio por 30 a 60 minutos. Embriões imaturos da linhagem de milho, A 188, ou outros genótipos de milho adequados são excisados de espigas de 8 a 12 dias de idade para LS-inf líquido + 100 µM de As (LSAs). Os embriões são turbilhonados por 5 segundos e enxaguados uma vez com meio de in-
5 fecção fresco. O meio de infecção é removido e a solução de *Agrobacterium* é em seguida adicionada e os embriões são turbilhonados por 30 segundos e deixados para sedimentar com as bactérias por 5 minutos. Em seguida, os embriões são transferidos com o lado do escutelo para cima para meio LSAs e cultivados no escuro por dois a três dias. Subsequentemente, entre 20 e
10 25 embriões por placa de Petri são transferidos para meio LSDc suplementado com cefotaxima (250 mg/l) e nitrato de prata (1,6 mg/l) (Negrotto et al., Plant Cell Rep 19:798-803 (2000)) e cultivados no escuro por 28°C por 10 dias. Embriões imaturos produzindo calo embriogênico são transferidos para
15 meio LSD1M0.5S (LSDc com 0,5 mg/l de 2,4-D ao invés de Dicamba, 10 g/l de manose, 5 g/l de sacarose e nenhum nitrato de prata). As culturas são selecionadas sobre este meio por 6 semanas com uma etapa de subcultura em 3 semanas. Calos sobreviventes são transferidos ou para meio LSD1M0.5S para serem avolumados ou para meio Reg1 (conforme descrito em Negrotto et al., Plant Cell Rep 19:798-803 (2000). Depois de cultura na
20 luz (regime de 16 horas de luz/ 8 horas de escuridão), os tecidos verdes são então transferidos para meio Reg2 sem reguladores do crescimento (conforme descrito em Negrotto et al., Plant Cell Rep 19:798-803 (2000) e incubados por 1 a 2 semanas. As platinhas são transferidas para caixas Magenta GA-7 (Magenta Corp, Chicago IU.) contendo meio Reg3 (conforme
25 descrito em Negrotto et al. 2000) e cultivadas na luz. Plantas que são PCR positivas para o cassete de expressão de fitase enzimaticamente suscetível são transferidas para o solo e cultivadas dentro da estufa.

A presença do gene de fitase enzimaticamente suscetível é determinada por ensaio de PCR +/- ou por um ensaio de número de cópias
30 Taqman®. A presença do marcador PMI seletivo é determinada por um ensaio de número de cópias Taqman®. A presença do marcador seletivo do gene de resistência a espectinomicina é determinada por ensaio de PCR +/-.

Exemplo 18: Análise de plantas de milho transgênicas expressando uma fitase enzimaticamente suscetível.

Semente transgênica será triturada em um moinho de martelos Perten 3100 equipado com uma tela de 2,0 mm deste modo gerando farinha de milho transgênica. Amostras de farinha (1 grama) de eventos transgênicos PCR positivos são extraídas em 50 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM de NaCl, 2 mM por 1 hora em temperatura ambiente com agitação. O volume de extração é 100 ml. Extratos são clarificados por centrifugação e diluídos com tampão de acetato de sódio (pH 5,5). A atividade de fitase é medida em uma faixa de pH essencialmente conforme descrito no Exemplo 10. São realizados ensaios em microlâminas em um volume de reação final de 1 ml.

Exemplo 19: Estudos de alimentação animal

Fitase expressada microbiana (8 variantes) será pré-misturada sobre um veículo de trigo para inclusão em múltiplos estudos de alimentação de frango a ser grelhado. A pré-mistura de enzima fitase será padronizada em aproximadamente 3.500 FTU/g de pré-mistura. A enzima fitase pré-misturada será incluída em rações à base de milho-SBM típicas formuladas para satisfazer todas as necessidades de frangos a serem grelhados jovens em crescimento com a exceção de fósforo. Fitase será adicionada às rações iniciadoras resultando em uma concentração final de 250 a 600 FTU de atividade de fitase por kg da ração final.

Dietas experimentais serão fornecidas à vontade quer em uma forma de mistura de ração de farelo ensopado quer em uma forma peletizada a vários grupos em replicata (4 a 10) de 5 a 8 frangos alojados em gaiolas de bateria em ambientes com controle ambiental. Além de dietas contendo enzimas experimentais, controle positivo (fósforo adequado), controle negativo (deficiente de fósforo) e adições em etapas de fósforo (curva padrão) serão introduzidos na ração para grupos em replicata similares de frangos para possibilitar análise da reação da enzima. A avaliação e caracterização da enzima serão determinadas usando características da performance (ingestão de ração, ganho de peso corporal e a proporção de ração para ganho durante o período de alimentação e usando o teor de cinzas da tibia

dos frangos ao final do período de alimentação. A análise da utilidade da enzima será realizada usando uma combinação de razão de inclinação, curva padrão, ANOVA e comparações de LSD protegidas de dados de performance e de cinzas da tíbia.

5 Exemplo 20: Estudos de peletização

Fitase expressada microbiana (8 variantes) será premisturada sobre um veículo de trigo para inclusão em múltiplos estudos de peletização em temperatura elevada. A pré-mistura de enzima fitase será padronizada em aproximadamente 3.500 FTU/g de pré-mistura. A enzima fitase pré-misturada será incluída em rações à base de milho-SBM típicas formuladas para satisfazer todas as necessidades de frangos a serem grelhados jovens em crescimento com a exceção de fósforo. Fitase será adicionada às rações iniciadoras resultando em uma concentração final de 250 a 750 FTU de atividade de fitase por kg da ração final. Dietas de mistura de ração de farelo ensopado totalmente misturadas contendo enzimas fitase experimentais serão peletizadas usando moinhos típicos de moinhos e métodos de processamento de ração da pesquisa corrente. A temperatura da dieta de peletização será variada para incluir amostras de rações peletizadas tiradas entre 70 e 100°C. A ração será peletizada durante múltiplos dias e analisada para atividade de fitase residual e será expressada como uma percentagem de atividade remanescente das amostras da mistura de ração de farelo ensopado (antes da peletização). A análise da atividade enzimática remanescente será realizada usando ANOVA e análise LDS protegida.

Exemplo 21: Método de produzir uma xilanase enzimaticamente suscetível

25 Genes de xilanase tais como os listados como SEQ ID 14 ou 16 da Patente U.S. Nº 7.291.493 podem ser modelados conforme descrito no Exemplo 1 usando estruturas cristalinas disponíveis no Research Collaboratory for Structural Bioinformation Protein Data Base (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), com a PDB ID: IXXN, 2DCY, IBW, 2Z79. Pode ser criado um modelo computacional de xilanase usando o programa de software Modeler dentro do pacote Insight II da Accelrys, Inc. e serão escolhidos os modelos com o menor valor de função objetiva.

Mutações para deglicosilação, remoção de ligações de dissulfeto intramolecular potenciais e introdução de sítios de clivagem de pepsina podem ser modeladas usando SwissPdb Viewer (Guex, N. and Peitsch, M.C. SWISS-MODEL e o Swiss PdbViewer: um ambiente para modelagem de proteína comparativa. Electrophoresis, 18, 2714-2723 (1997)). Variantes de xilanase podem ser então modificadas usando design racional conforme descrito nos Exemplos 2 a 5. Sítios de N-glicosilação para xilanase podem ser identificados por computação bem como por análise espectrométrica de massa das variantes de proteína expressadas em *Pichia* e endosperma de milho. Resíduos aminoácidos glicosilados correspondentes podem ser modificados para remover sítios de glicosilação em mutantes de xilanase. Resíduos cisteína específicos em xilanase podem ser identificados da sequência de aminoácidos de SEQ ID 14 ou 16 da Patente U.S. número 7.291.493. Resíduos cisteína participando em pontes de dissulfeto intramolecular serão direcionados para alteração. Resíduos cisteína de xilanase participando em pontes de dissulfeto intermolecular também podem ser direcionados para alteração.

Alterações podem ser mapeadas sobre o modelo tridimensional da proteína xilanase para evitar fazer alterações na estrutura global da proteína e sua capacidade para dobrar na conformação correta. Laços na estrutura da proteína xilanase podem ser identificados a partir do modelo da estrutura tridimensional da xilanase. Os laços particulares precisarão satisfazer os mesmos três critérios conforme identificado no Exemplo 4. Laços identificados podem ser então modificados inserindo ou substituindo o laço inteiramente com sequência de sítio de clivagem de pepsina altamente favorável (Keil B., Specificity of Proteolysis. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York p.335 (1992)).

Variantes podem ser então otimizadas para expressão bacteriana convertendo por computação a sequência de proteína em sequência de polinucleotídeos. A sequência de polinucleotídeos pode ser então otimizada para expressão de *E. coli*. As sequências de polinucleotídeos otimizadas por *E. coli* podem ser então sintetizadas e subclonadas em vetor de expressão de *E. coli* pFLEX HX pela GeneArt, Regensburg, Alemanha. O vetor final con-

terá um cassete de expressão o qual inclui a sequência de polinucleotídeos otimizada por códons para a fitase enzimaticamente suscetível ligada a uma His-tag N-terminal. Cassetes de expressão otimizados por códons bacterianos contendo xilanases enzimaticamente suscetíveis de pFLEX HX podem
5 ser então clonados em vetores de expressão pET24a (Invitrogen) e pFLEXHX T7 conforme descrito no Exemplo 7. Os vetores pET24 e pFLEXHX T7 contendo os cassetes de expressão podem ser então transformados em células de *E. coli* BL21[DE3] (Invitrogen) e cultivados em meio LB contendo canamicina (50 µg/ml) conforme descrito no Exemplo 8. Xilanase po-
10 de ser isolada a partir destes transformantes de *E. coli* conforme descrito no Exemplo 8.

A digestibilidade em fluido gástrico simulado de amostras de proteína xilanase será realizada basicamente conforme descrito em Thomas et al., *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 39:87-98 (2004) e conforme
15 descrito no Exemplo 9. A atividade de xilanase pode ser analisada sobre várias faixas de pH, polimerização e termotolerância conforme descrito nos Exemplos 10 e 11 usando um método de teste de xilanase conforme revelado na publicação de patente internacional PCT número WO 2007/ 146944. Com base nos dados gerados a partir dos mutantes de xilanase expressa-
20 dos e isolados a partir de bactérias, combinações específicas de variantes serão selecionadas para análise conforme descrito nos Exemplos 12 a 15 usando o método de teste de xilanase da publicação de patente internacional PCT número WO 2007/146944.

Variantes de xilanase selecionadas serão otimizadas por códons
25 para expressão vegetal, sintetizadas e subclonadas em vetor de expressão de *E. coli* pFLEX HX conforme descrito no Exemplo 16. Vetores de transformação vegetal contendo genes de xilanase mutada podem ser construídos essencialmente conforme descrito no Exemplo 17. Plantas transgênicas serão criadas expressando xilanases enzimaticamente suscetíveis usando
30 transformação por *Agrobacterium* conforme descrito no Exemplo 16. Plantas de milho transgênicas expressando uma xilanase enzimaticamente suscetível podem ser então analisadas usando o método da xilanase revelado na

publicação de patente internacional PCT número WO 2007/ 146944.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de aumentar a sensibilidade de uma fitase derivada de *Escherichia coli* a uma pepsina, **caracterizado** pelo fato de que compreende as etapas de:

- 5 a) criar variantes de fitase com aumentada estabilidade termodinâmica;
- b) modelar a estrutura tridimensional da proteína,
- c) identificar domínios do modelo tridimensional, em que os domínios são selecionados do grupo consistindo em domínios de glicosilação,
- 10 resíduos cisteína, e laços de uma estrutura de proteína que são expostos ao meio circundante;
- d) criar variantes de fitase alterando os refoldos domínios do modelo tridimensional;
- e) selecionar variantes com termotolerância e atividade específica de fitase no mínimo igual à fitase,
- 15 f) testar as variantes da etapa (e) para sensibilidade à pepsina, em que a sensibilidade resulta na digestão da variante quando exposta à pepsina.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo

20 fato de que a modelagem é selecionada entre o grupo consistindo em cristalografia de raios X, ressonância magnética nuclear e modelagem computacional.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo

 fato de que a referida protease da etapa (a) apresenta estabilidade em fluido

25 gástrico simulado por no mínimo 10 minutos.

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

 fato de que a referida fitase é Nov9X.