



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

(21) PI 0914780-2 A2



(22) Data do Depósito: 25/06/2009

(43) Data da Publicação Nacional: 14/07/2020

(54) Título: GENES DE TOXINA E MÉTODOS PARA USO DOS MESMOS

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

(30) Prioridade Unionista: 06/03/2009 US 61/158,137; 25/06/2008 US 61/075,719.

(71) Depositante(es): ATHENIX CORPORATION.

(72) Inventor(es): SHRUTI AGARWAL; CHRIS CAMPBELL; BRIAN MCNULTY; KIMBERLY S. SAMPSON; DANIEL J. TOMSO.

(86) Pedido PCT: PCT US2009048614 de 25/06/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/158470 de 30/12/2009

(85) Data da Fase Nacional: 15/12/2010

(57) Resumo: GENES DE TOXINA E MÉTODOS PARA USO DOS MESMOS A presente invenção refere-se a composições e a métodos para conferir atividade pesticida a bactérias, plantas, células vegetais, tecidos e sementes. São fornecidas composições que compreendem uma sequência codificadora de um polipeptídeo de delta-endotoxina. As sequências codificadoras podem ser utilizadas em construtos de DNA ou cassetes de expressão para a transformação e a expressão em plantas e bactérias. As composições compreendem ainda bactérias, plantas, células vegetais, tecidos e sementes transformados. Em particular, são fornecidas moléculas de ácidos nucleicos de delta-endotoxina isoladas. Adicionalmente, são abrangidas as sequências de aminoácidos que correspondem aos polinucleotídeos e os anticorpos que se ligam especificamente a tais sequências de aminoácidos. Em particular, a presente invenção refere-se a moléculas de ácidos nucleicos isoladas que compreendem sequências de nucleotídeos que codificam a sequência de aminoácidos mostrada nas SEQ ID NO: 61-121 e 133-141 ou a sequência de nucleotídeos apresentada nas SEQ ID NO: 1-60, 124-132 e 142-283, bem como variantes e fragmentos das mesmas.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**GENES DE TOXINA E MÉTODOS PARA USO DOS MESMOS**".

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao campo da biologia molecular.

- 5 São fornecidos novos genes que codificam proteínas pesticidas. Estas proteínas e as sequências de ácidos nucleicos que codificam as mesmas são úteis na preparação de formulações pesticidas e na produção de plantas transgênicas resistentes a pragas.

ANTECEDENTE DA INVENÇÃO

- 10 *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria do solo formadora de esporos Gram-positiva caracterizada por sua capacidade de produzir inclusões cristalinas que são especificamente tóxicas para certas ordens e espécies de insetos, mas são inofensivas para as plantas e outros organismos são direcionados. Por esta razão, composições que incluem cepas de *Bacillus thuringiensis* ou suas proteínas inseticidas podem ser utilizadas como inseticidas ambientalmente aceitáveis para controlar pragas de insetos agrícolas ou vetores de insetos para uma variedade de doenças humanas ou de animais.

- 15 As proteínas em cristal (Cry) (delta-endotoxinas) de *Bacillus thuringiensis* possuem atividade inseticida potente contra predominantemente larvas de Lepidópteros, Dípteros e Coleópteros. Estas proteínas também exibiram atividade contra as ordens de pragas *Hymenoptera*, *Homoptera*, *Phthiraptera*, *Mallophaga* e *Acarí*, bem como outras ordens de invertebrados tais como *Nemathelminthes*, *Platyhelminthes* e *Sarcomastigophora* (Feitelson (1993) The *Bacillus Thuringiensis* family tree. In *Advanced Engineered*
- 20 *Pesticides*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.) Estas proteínas foram classificadas originalmente como CryI até CryV com base primariamente em sua atividade inseticida. As classes principais eram específicas a *Lepidoptera* (I), específicas a *Lepidoptera* e a *Diptera* (II), específicas a *Coleoptera* (III), específicas a *Diptera* (IV) e específicas a nematoides (V) e (VI). As proteínas
- 25 foram adicionalmente classificadas em subfamílias; as proteínas mais altamente relacionadas dentro de cada família receberam letras divisionais tais como *Cry1A*, *Cry1B*, *Cry1C*, etc. Proteínas ainda mais intimamente relacio-
- 30

nadas dentro de cada divisão receberam nomes tais como *Cry1C1*, *Cry1C2*, etc.

Uma nova nomenclatura foi descrita recentemente para os genes Cry com base na homologia de sequências de aminoácidos ao invés da especificidade ao inseto-alvo (Crickmore e outros (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807-813). Na nova classificação, cada toxina recebe um nome único que incorpora uma classe primária (um número arábico), uma classe secundária (uma letra maiúscula), uma classe terciária (uma letra minúscula) e uma classe quaternária (outro número arábico). Na nova classificação, números romanos foram trocados por número arábicos na classe primária. As proteínas com menos que 45% de identidade de sequência possuem classes primárias diferentes e os critérios para as classes secundárias e terciárias são 78% e 95%, respectivamente.

A proteína em cristal não exibe atividade inseticida até ser ingerida e solubilizada no intestino médio do inseto. A pró-toxina ingerida é hidrolisada por proteases no trato digestivo dos insetos em uma molécula tóxica ativa. (Höfte e Whiteley (1989) *Microbiol. Rev.* 53:242-255). Esta toxina se liga aos receptores de borda de microvilosidades apicais no intestino médio da larva alvo e se insere dentro da membrana apical criando canais iônicos ou poros, resultando na morte da larva.

As delta-endotoxinas possuem geralmente cinco domínios de sequências conservados e três domínios estruturais conservados (ver, por exemplo, de Maagd e outros (2001) *Trends Genetics* 17:193-199). O primeiro domínio estrutural conservado consiste em sete alfa hélices e está envolvido na inserção na membrana e na formação de poros. O domínio II consiste em três folhas beta dispostas em uma configuração de chave grega e o domínio III consiste em duas folhas beta antiparalelas na formação "jelly-roll" (de Maagd e outros, 2001, supra). Os domínios II e III estão envolvidos no reconhecimento e na ligação de receptores e são, portanto, considerados determinantes da especificidade da toxina.

O uso intensivo de inseticidas à base de *B. thuringiensis* já deu origem à resistência em populações de campo da traça do gênero *Scythro-*

pia, Plutella xylostella (Ferré e Van Rie (2002) *Annu. Rev. Entomol.* 47:501-533). O mecanismo mais comum de resistência é a redução da ligação da toxina com seu(s) receptor(es) no intestino médio específico(s). Isto também pode conferir resistência cruzada a outras toxinas que compartilham o mesmo receptor (Ferré e Van Rie (2002)).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

As composições e os métodos para conferir pragas resistentes a bactérias, plantas, células vegetais, tecidos e sementes são fornecidos. As composições incluem moléculas de ácidos nucleicos que codificam sequências para polipeptídeos de delta-endotoxina, vetores que compreendem tais moléculas de ácidos nucleicos e células hospedeiras que compreendem os vetores. As composições incluem ainda as sequências polipeptídicas da endotoxina e anticorpos para tais polipeptídeos. As sequências de nucleotídeos podem ser utilizadas em construtos de DNA ou cassetes de expressão para a transformação e a expressão em organismos, incluindo micro-organismos e plantas. As sequências de nucleotídeos ou de aminoácidos podem ser sequências sintéticas que foram planejadas para a expressão no organismo que inclui, mas não está limitado a um micro-organismo ou uma planta. As composições compreendem ainda bactérias, plantas, células vegetais, tecidos e sementes transformados.

Em particular, são fornecidas moléculas de ácidos nucleicos isoladas que correspondem às sequências de ácidos nucleicos da delta-endotoxina. Adicionalmente, são abrangidas as sequências de aminoácidos que correspondem aos polinucleotídeos. Em particular, a presente invenção fornece uma molécula de ácido nucleico isolada que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica a sequência de aminoácidos mostrada em qualquer uma das SEQ ID NO: 61-121 e 133-141 ou uma sequência de nucleotídeos apresentada em qualquer uma das SEQ ID NO: 1-60 e 124-132, bem como variantes e fragmentos das mesmas. As sequências de nucleotídeos que são complementares a uma sequência de nucleotídeos da invenção ou que se hibridizam com uma sequência da invenção também são abrangidas.

As composições e os métodos da invenção são úteis para a produção de organismos com resistência a pesticidas, especificamente bactérias e plantas. Estes organismos e composições derivadas dos mesmos são desejáveis para as finalidades agrícolas. As composições da invenção também são úteis para gerar proteínas de delta-endotoxina alteradas ou melhoradas que possuem atividade pesticida ou para a detecção da presença de proteínas ou ácidos nucleicos de delta-endotoxina nos produtos ou nos organismos.

DESCRIÇÃO DETALHADA

A presente invenção retrata composições e métodos para a regulação da resistência a pragas em organismos, particularmente plantas ou células vegetais. Os métodos envolvem a transformação de organismos com uma sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína de delta-endotoxina da invenção. Em particular, as sequências de nucleotídeos da invenção são úteis para a preparação de plantas e micro-organismos que possuem atividade pesticida. Assim, são fornecidas as bactérias, plantas, células vegetais, tecidos vegetais e sementes transformados. As composições são ácidos nucleicos e proteínas da delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis*. As sequências encontram uso na construção de vetores de expressão para a transformação subsequente em organismos de interesse, como sondas para o isolamento de outros genes da delta-endotoxina e para a produção de proteínas pesticidas alteradas através de métodos conhecidos na técnica, tais como permuta de domínios ou embaralhamento de DNA. As proteínas encontram uso no controle e na morte de populações de pragas de lepidópteros, coleópteros e nematoides e para a produção de composições com atividade pesticida.

Por "delta-endotoxina" é pretendida uma toxina proveniente de *Bacillus thuringiensis* que possui atividade tóxica contra uma ou mais pragas, incluindo, mas não limitadas a, membros das ordens *Lepidoptera*, *Diptera* e *Coleoptera* ou membros do filo *Nematoda* ou uma proteína que possui homologia a tal proteína. Em alguns casos, as proteínas de delta-endotoxina foram isoladas de outros organismos, incluindo *Clostridium bifermentans* e

Paenibacillus popilliae. As proteínas de delta-endotoxina incluem sequências de aminoácidos deduzidas das sequências de nucleotídeos de comprimento completo divulgadas aqui e das sequências de aminoácidos que são mais curtas que as sequências de comprimento completo, devido ao uso de um sítio de início a jusante alternativo ou devido ao processamento que produz uma proteína mais curta que possui atividade pesticida. O processamento pode ocorrer no organismo no qual a proteína é expressa ou na praga após a ingestão da proteína.

As delta-endotoxinas incluem proteínas identificadas como *cry1* até *cry43*, *cyt1* e *cyt2* e toxina similar a Cyt. Há atualmente mais de 250 espécies conhecidas de delta-endotoxinas com uma faixa ampla de especificidades e toxicidades. Para uma lista extensa ver Crickmore e outros (1998), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807-813 e para atualizações regulares ver Crickmore e outros (2003) "*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature", em www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.

São fornecidas aqui novas sequências de nucleotídeos isoladas que conferem atividade pesticida. Também são fornecidas as sequências de aminoácidos das proteínas de delta-endotoxina. A proteína que resulta da tradução deste gene permite que as células controlem ou matem as pragas que a ingere.

Moléculas de Ácidos Nucleicos Isoladas e Variantes e Fragmentos das Mesmas

Um aspecto da invenção refere-se a moléculas de ácidos nucleicos isoladas ou recombinantes que compreendem sequências de nucleotídeos que codificam proteínas e polipeptídeos de delta-endotoxina ou porções biologicamente ativas dos mesmos, bem como moléculas de ácidos nucleicos suficientes para uso como sondas de hibridização para a identificação de ácidos nucleicos que codificam a delta-endotoxina. Como utilizado aqui, é pretendido que o termo "molécula de ácido nucleico" inclua moléculas de DNA (por exemplo, DNA recombinante, cDNA ou DNA genômico) e moléculas de RNA (por exemplo, mRNA) e análogos do DNA ou do RNA gerado utilizando análogos de nucleotídeos. A molécula de ácido nucleico

pode ser de fita simples ou de fita dupla, mas preferencialmente é DNA de fita dupla.

Uma molécula de ácido nucleico ou proteína "isolada" ou "purificada" ou uma porção biologicamente ativa da mesma está substancialmente livre de outro material celular ou meio de cultura quando produzida através de técnicas recombinantes ou substancialmente livre de precursores químicos ou outros reagentes químicos quando sintetizada quimicamente. Preferencialmente, um ácido nucleico "isolado" está livre de sequências (preferencialmente sequências que codificam proteínas) que flanqueiam naturalmente o ácido nucleico (isto é, sequências localizadas nas extremidades a 5' e a 3' do ácido nucleico) no DNA genômico do organismo do qual o ácido nucleico é derivado. Para as finalidades da invenção, "isolada(s)" quando utilizado para se referir a moléculas de ácidos nucleicos exclui cromossomos isolados. Por exemplo, em várias modalidades, a molécula de ácido nucleico que codifica a delta-endotoxina isolada pode conter menos que aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb ou 0,1 kb de sequências de nucleotídeos que flanqueiam naturalmente a molécula de ácido nucleico no DNA genômico da célula da qual o ácido nucleico é derivado. Uma proteína de delta-endotoxina que é substancialmente livre de material celular inclui preparações de proteína que possuem menos que aproximadamente 30%, 20%, 10% ou 5% (em peso seco) de proteína não delta-endotoxina (também referida aqui como uma "proteína contaminante").

As sequências de nucleotídeos que codificam as proteínas da presente invenção incluem a sequência apresentada nas SEQ ID NO: 1-60 e 124-132 e variantes, fragmentos e complementos das mesmas. Por "complemento" pretende-se uma sequência de nucleotídeos que é suficientemente complementar a certa sequência de nucleotídeos de forma que possa se hibridizar com a sequência de nucleotídeos fornecida para formar assim um dúplex estável. A sequência de aminoácidos correspondente da proteína de delta-endotoxina codificada por esta sequência de nucleotídeos é apresentada nas SEQ ID NO: 61-121 e 133-141.

As moléculas de ácidos nucleicos que são fragmentos destas

sequências de nucleotídeos que codificam a delta-endotoxina também são abrangidas pela presente invenção. Por "fragmento" é pretendida uma parte da sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína de delta-endotoxina. Um fragmento de uma sequência de nucleotídeos pode codificar uma porção biologicamente ativa de uma proteína de delta-endotoxina ou pode ser um fragmento que pode ser utilizado como uma sonda de hibridização ou um iniciador da PCR utilizando métodos divulgados a seguir. As moléculas de ácidos nucleicos que são fragmentos de uma sequência de nucleotídeos de delta-endotoxina compreendem pelo menos aproximadamente 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1550, 1600, 1650, 1700, 1750, 1800, 1850, 1900, 1950, 2000, 2050, 2100, 2150, 2200, 2250, 2300, 2350, 2400, 2450, 2500, 2550, 2600, 2650, 2700, 2750, 2800, 2850, 2900, 2950, 3000, 3050, 3100, 3150, 3200, 3250, 3300, 3350 nucleotídeos contíguos ou até o número de nucleotídeos presentes em uma sequência de nucleotídeos que codifica delta-endotoxina de comprimento completo divulgada aqui dependendo do uso pretendido. Por nucleotídeos "contíguos" pretendem-se resíduos de nucleotídeos que ficam imediatamente adjacentes um ao outro. Os fragmentos das sequências de nucleotídeos da presente invenção codificarão fragmentos de proteínas que mantêm a atividade biológica da proteína de delta-endotoxina e, conseqüentemente, mantêm a atividade pesticida. Por "mantém a atividade" pretende-se que o fragmento terá pelo menos aproximadamente 30%, pelo menos aproximadamente 50%, pelo menos aproximadamente 70%, 80%, 90%, 95% ou mais da atividade pesticida da proteína de delta-endotoxina. Os métodos para medir a atividade pesticida são bem conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Czaplá e Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews e outros (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone e outros (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293; e Patente U.S. Nº 5.743.477, dos quais todos são incorporados aqui como referência em sua totalidade.

Um fragmento de uma sequência de nucleotídeos que codifica delta-endotoxina que codifica uma porção biologicamente ativa de uma pro-

teína da invenção codificará pelo menos aproximadamente 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100 aminoácidos contíguos ou até o número total de aminoácidos presentes em uma proteína de delta-endotoxina de comprimento completo da invenção.

As proteínas de delta-endotoxina preferidas da presente invenção são codificadas por uma sequência de nucleotídeos suficientemente idêntica à sequência de nucleotídeos das SEQ ID NO: 1-60 e 124-132. Por "suficientemente idêntica" pretende-se uma sequência de aminoácidos ou de nucleotídeos que possui pelo menos aproximadamente 60% ou 65% de identidade de sequência, aproximadamente 70% ou 75% de identidade de sequência, aproximadamente 80% ou 85% de identidade de sequência, aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou identidade de sequência maior comparada com uma sequência de referência utilizando um dos programas de alinhamento descritos aqui utilizando parâmetros padronizados. Um versado na técnica reconhecerá que estes valores podem ser apropriadamente ajustados para determinar a identidade correspondente de proteínas codificadas por duas sequências de nucleotídeos levando em consideração a degeneração do código, a similaridade dos aminoácidos, o posicionamento do quadro de leitura e similar.

Para determinar a porcentagem de identidade de duas sequências de aminoácidos ou de dois ácidos nucleicos, as sequências são alinhadas com a finalidade de comparação ótima. A porcentagem de identidade entre as duas sequências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas sequências (isto é, porcentagem de identidade = número de posições idênticas/número total de posições (por exemplo, posições sobrepostas) x 100). Em uma modalidade, as duas sequências possuem o mesmo comprimento. Em outra modalidade, a comparação é realizada ao longo da totalidade da sequência de referência (por exemplo, ao longo da totalidade de uma das SEQ ID NO: 1-60 e 124-132 ou ao longo da totalidade de uma das SEQ ID NO: 61-121 e 133-141). A porcentagem de identidade entre duas sequências pode ser determinada utilizando técnicas similares às

descritas abaixo, com ou sem a permissão de espaços ("gaps"). No cálculo da porcentagem de identidade, tipicamente são contadas as combinações exatas.

A determinação de porcentagem de identidade entre duas se-
5 quências pode ser realizada utilizando um algoritmo matemático. Um exem-
plo não limitante de um algoritmo matemático utilizado para a comparação
de duas sequências é o algoritmo de Karlin e Altschul (1990) *Proc. Natl. A-
cad. Sci. USA* 87:2264, modificado como em Karlin e Altschul (1993) *Proc.
Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Tal algoritmo é incorporado nos progra-
10 mas BLASTN e BLASTX de Altschul e outros (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403.
As buscas de nucleotídeos com BLAST podem ser realizadas com o pro-
grama BLASTN, *escore* = 100, comprimento de palavra = 12, para a obten-
ção de sequências de nucleotídeos homólogas a moléculas de ácidos nucle-
icos similares à delta-endotoxina da invenção. As buscas de proteínas com
15 BLAST podem ser realizadas com o programa BLASTX, *escore* = 50, com-
primento de palavra = 3, para a obtenção de sequências de aminoácidos
homólogas às moléculas de proteína de delta-endotoxina da invenção. Para
a obtenção de alinhamentos com espaços com a finalidade de comparação,
Gapped BLAST (em BLAST 2.0) pode ser utilizado como descrito em Alts-
20 chul e outros (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. Alternativamente, o PSI-
Blast pode ser utilizado para realizar uma busca repetida que detecta rela-
ções distantes entre as moléculas. Ver Altschul e outros (1997) *supra*.
Quando os programas BLAST, Gapped BLAST e PSI-Blast são utilizados, os
parâmetros pré-estabelecidos dos respectivos programas (por exemplo,
25 BLASTX e BLASTN) podem ser utilizados. O alinhamento também pode ser
realizado de forma manual por inspeção.

Outro exemplo não limitante de um algoritmo matemático utiliza-
do para a comparação de sequências é o algoritmo ClustalW (Higgins e ou-
tros (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680). ClustalW compara sequên-
30 cias e alinha a totalidade da sequência de aminoácidos ou de DNA e assim
pode fornecer dados em relação à conservação de sequência da sequência
de aminoácidos inteira. O algoritmo ClustalW é utilizado em vários pacotes

de software para análise de DNA/aminoácidos disponíveis comercialmente, tais como o módulo ALIGNX do Vector NTI Program Suite (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Após o alinhamento das sequências de aminoácidos com ClustalW, a porcentagem de identidade de aminoácidos pode ser avaliada. Um exemplo não limitante de um programa de software útil para a análise de alinhamentos com ClustalW é GENEDOC®. GENEDOC® (Karl Nicholas) permite a avaliação da similaridade ou da identidade de aminoácidos (ou DNA) entre várias proteínas. Outro exemplo não limitante de um algoritmo matemático utilizado para a comparação de sequências é o algoritmo de Myers e Miller (1988) *CABIOS* 4:11-17. Tal algoritmo é incorporado no programa ALIGN (versão 2.0), que faz parte do GCG Wisconsin Genetics Software Package, Versão 10 (disponível na Accelrys, Inc., 9685 Scranton Rd., San Diego, CA, USA). Quando o programa ALIGN é utilizado para a comparação das sequências de aminoácidos, uma tabela de resíduos de peso PAM120, uma penalidade de comprimento de espaço de 12 e uma penalidade de espaço de 4 podem ser utilizadas.

A não ser que seja relatado de outra maneira, GAP Versão 10, que utiliza o algoritmo de Needleman e Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48(3):443-453, será utilizado para determinar a identidade ou a similaridade de sequência utilizando os parâmetros a seguir: % de identidade e % de similaridade para uma sequência de nucleotídeos utilizando Peso de Espaço de 50 e Peso de Comprimento de 3 e a matriz de classificação nws gapdna.cmp; % de identidade ou % de similaridade para uma sequência de aminoácidos utilizando Peso de Espaço de 8 e Peso de Comprimento de 2 e o programa de classificação BLOSUM62. Programas equivalentes também podem ser utilizados. Por "programa equivalente" pretende-se qualquer programa de comparação de sequências que, para quaisquer duas sequências em questão, gera um alinhamento que possui combinações de resíduos de nucleotídeos idênticas e uma porcentagem de identidade de sequências idêntica quando comparado com o alinhamento correspondente gerado por GAP Versão 10. A invenção abrange ainda moléculas de ácidos nucleicos variantes. "Variantes" das sequências de nucleotídeos que codificam a delta-

endotoxina incluem aquelas sequências que codificam as proteínas de delta-endotoxina divulgadas aqui, mas que diferem de forma conservativa por causa da degeneração do código genético bem como aquelas que são suficientemente idênticas às discutidas anteriormente. Variantes alélicas que ocorrem naturalmente podem ser identificadas com o uso de técnicas de biologia molecular bem conhecidas, tais como reação em cadeia da polimerase (PCR) e técnicas de hibridização que são descritas abaixo. As sequências de nucleotídeos variantes incluem ainda sequências de nucleotídeos derivadas sinteticamente que foram geradas, por exemplo, através da utilização de mutagênese direcionada ao sítio, mas que ainda codificam as proteínas de delta-endotoxina divulgadas na presente invenção como discutido abaixo. As proteínas variantes abrangidas pela presente invenção são biologicamente ativas, isto é, continuam possuindo a atividade biológica desejada da proteína nativa, isto é, mantendo a atividade pesticida. Por "mantém a atividade" pretende-se que a variante terá pelo menos aproximadamente 30%, pelo menos aproximadamente 50%, pelo menos aproximadamente 70% ou pelo menos aproximadamente 80% da atividade pesticida da proteína nativa. Os métodos para medir a atividade pesticida são bem conhecidos na arte. Ver, por exemplo, Czaplá e Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83: 2480-2485; Andrews e outros (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone e outros (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293; e Patente U.S. Nº 5.743.477, dos quais todos são incorporados aqui como referência em sua totalidade.

O versado na técnica considerará ainda que modificações podem ser introduzidas através da mutação das sequências de nucleotídeos da invenção levando assim a modificações na sequência de aminoácidos das proteínas de delta-endotoxina codificadas, sem alterar a atividade biológica das proteínas. Assim, podem ser criadas moléculas de ácidos nucleicos variantes isoladas através da introdução de uma ou mais substituições, adições ou deleções de nucleotídeos na sequência de nucleotídeos correspondente divulgada aqui, de forma que uma ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos são introduzidas na proteína codificada. Mutações podem ser introduzidas através de técnicas padronizadas, tais como muta-

gênese direcionada ao sítio e mutagênese mediada por PCR. Tais sequências de nucleotídeos variantes são também abrangidas pela presente invenção.

Por exemplo, substituições conservativas de aminoácidos podem ser realizadas em um ou mais resíduos de aminoácidos não essenciais previstos. Um resíduo de aminoácido "não essencial" é um resíduo que pode ser alterado partindo da sequência do tipo selvagem de uma proteína de delta-endotoxina sem alterar a atividade biológica, enquanto que um resíduo de aminoácido "essencial" é necessário para a atividade biológica. Uma "substituição conservativa de aminoácidos" é uma em que o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido que possui uma cadeia lateral similar. As famílias de resíduos de aminoácidos que possuem cadeias laterais similares foram definidas na técnica. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais beta ramificadas (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina).

As delta-endotoxinas geralmente possuem cinco domínios de sequência conservados e três domínios estruturais conservados (ver, por exemplo, de Maagd e outros (2001) *Trends Genetics* 17:193-199). O primeiro domínio estrutural conservado consiste em sete alfa hélices e está envolvido na inserção de membrana e na formação de poros. O domínio II consiste em três folhas beta dispostas em uma configuração de chave grega e o domínio III consiste em duas folhas beta antiparalelas na formação "jelly-roll" (de Maagd e outros, 2001, supra). Os domínios II e III estão envolvidos no reconhecimento e na ligação com o receptor e são, portanto, considerados determinantes da especificidade da toxina.

As substituições de aminoácidos podem ser feitas em regiões

não conservadas que mantêm a função. Em geral, tais substituições não seriam feitas para resíduos de aminoácidos conservados ou para resíduos de aminoácidos que residem dentro de um motivo conservado, em que tais resíduos são essenciais para a atividade da proteína. Os exemplos de resíduos que são conservados e que podem ser essenciais para a atividade da proteína incluem, por exemplo, resíduos que são idênticos entre todas as proteínas contidas em um alinhamento das sequências de aminoácidos da presente invenção e sequências de delta-endotoxina conhecidas. Os exemplos de resíduos que são conservados, mas que podem permitir substituições conservativas de aminoácidos e ainda mantêm a atividade incluem, por exemplo, resíduos que possuem apenas substituições conservativas entre todas as proteínas contidas em um alinhamento das sequências de aminoácidos da presente invenção e sequências de delta-endotoxina conhecidas. Entretanto, um versado na técnica entenderia que variantes funcionais podem ter alterações conservadas ou não conservadas menos importantes nos resíduos conservados.

Alternativamente, as sequências de nucleotídeos variantes podem ser produzidas através da introdução de mutações de forma aleatória ao longo de toda ou de parte da sequência codificadora, tal como através de mutagênese por saturação e os mutantes resultantes podem ser verificados em relação à capacidade de conferir atividade de delta-endotoxina para a identificação de mutantes que mantêm atividade. Após a mutagênese, a proteína codificada pode ser expressa de forma recombinante e a atividade da proteína pode ser determinada utilizando técnicas de ensaio padronizadas.

Utilizando métodos tal como a PCR, a hibridização e as sequências de delta-endotoxina correspondentes similares podem ser identificadas, tais sequências possuindo identidade substancial com as sequências da invenção. Ver, por exemplo, Sambrook e Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) e Innis, e outros (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, NY).

Em um método de hibridização, toda ou parte da sequência de

nucleotídeos de delta-endotoxina pode ser utilizada para verificar bibliotecas de cDNA ou genômicas. Os métodos para a construção de tais bibliotecas de cDNA e genômicas são geralmente conhecidos na técnica e são divulgados em Sambrook e Russell, 2001, *supra*. As assim chamadas sondas de hibridização podem ser fragmentos de DNA genômico, fragmentos de cDNA, fragmentos de RNA ou outros oligonucleotídeos e podem ser marcadas com um grupo que pode ser detectado tal como ^{32}P ou qualquer outro marcador que pode ser detectado, tal como outros radioisótopos, um composto fluorescente, uma enzima ou um cofator de enzima. As sondas para hibridização podem ser produzidas através da marcação de oligonucleotídeos sintéticos baseada na sequência de nucleotídeos que codifica a delta-endotoxina conhecida divulgada aqui. Os iniciadores degenerados planejados com base nos resíduos de nucleotídeos ou de aminoácidos conservados na sequência de nucleotídeos ou na sequência de aminoácidos codificada podem ser adicionalmente utilizados. A sonda compreende tipicamente uma região de sequência de nucleotídeos que se hibridiza sob condições estridentes com pelo menos aproximadamente 12, pelo menos aproximadamente 25, pelo menos aproximadamente 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350 ou 400 nucleotídeos consecutivos da sequência de nucleotídeos que codifica a delta-endotoxina da invenção ou um fragmento ou um variante da mesma. Os métodos para a preparação de sondas para hibridização são geralmente conhecidos na técnica e são divulgados em Sambrook e Russell, 2001, *supra* incorporados aqui por referência.

Por exemplo, uma sequência de delta-endotoxina inteira divulgada aqui ou uma ou mais porções da mesma, pode ser utilizada como uma sonda capaz de se hibridizar especificamente com as sequências similares à delta-endotoxina correspondentes e os RNAs mensageiros. Para atingir a hibridização específica sob uma variedade de condições, tais sondas incluem sequências que são únicas e possuem preferencialmente pelo menos aproximadamente 10 nucleotídeos de comprimento ou pelo menos aproximadamente 20 nucleotídeos de comprimento. Tais sondas podem ser utilizadas para amplificar sequências de delta-endotoxina correspondentes de

um organismo escolhido através de PCR. Esta técnica pode ser utilizada para isolar sequências codificadoras adicionais de um organismo desejado ou como um ensaio de diagnóstico para determinar a presença de sequências codificadoras em um organismo. As técnicas de hibridização incluem a
5 verificação da hibridização de bibliotecas de DNA plaqueadas (placas ou colônias; ver, por exemplo, Sambrook e outros (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

A hibridização de tais sequências pode ser realizada sob condições estridentes. Por "condições estridentes" ou "condições de hibridização estridentes" pretendem-se condições sob as quais uma sonda irá se hibridizar com sua sequência-alvo até um grau de detecção maior que outras sequências (por exemplo, pelo menos 2 vezes em relação ao fundo). As condições estridentes são dependentes da sequência e serão diferentes
15 em circunstâncias diferentes. Para o controle da estridência das condições de hibridização e/ou de lavagem, as sequências-alvo que são 100% complementares à sonda podem ser identificadas (sondagem homóloga). Alternativamente, as condições de estridência podem ser ajustadas para permitir algum pareamento errado nas sequências de forma que graus de similaridade menores são detectados (sondagem heteróloga). Geralmente, uma
20 sonda tem menos que aproximadamente 1000 nucleotídeos de comprimento, preferencialmente menos que 500 nucleotídeos de comprimento.

Tipicamente, as condições estridentes serão aquelas em que a concentração de sal é menor que aproximadamente 1,5 M de íon Na, tipicamente aproximadamente 0,01 até 1,0 M de concentração de íon Na (ou outros sais) em pH 7,0 até 8,3 e a temperatura é de pelo menos aproximadamente 30°C para sondas curtas (por exemplo, 10 até 50 nucleotídeos) e de pelo menos aproximadamente 60°C para sondas longas (por exemplo, maiores que 50 nucleotídeos). As condições estridentes também podem ser atingidas com a adição de agentes de desestabilização tais como formamida.
30 Os exemplos de condições de estridência baixa incluem a hibridização com uma solução tampão de 30 até 35% de formamida, 1 M de NaCl, 1% de SDS

(dodecil sulfato de sódio) a 37°C e uma lavagem em 1X até 2X SSC (20X SSC = 3,0 M de NaCl/0,3 M de citrato trissódico) a 50 até 55°C. Os exemplos de condições de estringência moderada incluem a hibridização em 40 até 45% de formamida, 1,0 M de NaCl, 1% de SDS a 37°C e uma lavagem em 0,5X até 1X SSC a 55 até 60°C. Os exemplos de condições de estringência alta incluem a hibridização em 50% de formamida, 1 M de NaCl, 1% de SDS a 37°C e uma lavagem em 0,1X SSC a 60 até 65°C. Opcionalmente, os tampões de lavagem podem compreender aproximadamente 0,1% até aproximadamente 1% de SDS. A duração da hibridização é geralmente menor que aproximadamente 24 horas, geralmente aproximadamente 4 até aproximadamente 12 horas.

A especificidade é tipicamente a função de lavagens pós-hibridização, os fatores críticos sendo a força iônica e a temperatura da solução de lavagem final. Para os híbridos DNA-DNA, a T_m pode ser aproximada da equação de Meinkoth e Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138:267-284: $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ de form}) - 500/L$; em que M é a molaridade de cátions monovalentes, %GC é a porcentagem dos nucleotídeos guanossina e citosina no DNA, % de form é a porcentagem de formamida na solução de hibridização e L é o comprimento do híbrido em pares de bases. A T_m é a temperatura (sob força iônica e pH definidos) em que 50% de uma sequência alvo complementar se hibridizam com uma sonda perfeitamente combinada. A T_m é reduzida em aproximadamente 1°C para cada 1% de pareamento errado; assim, a T_m , a hibridização e/ou as condições de lavagem podem ser ajustadas para ocorrer a hibridização com sequências da identidade desejada. Por exemplo, se forem buscadas sequências com $\geq 90\%$ de identidade, a T_m pode ser diminuída 10°C. Geralmente, as condições estridentes são selecionadas como sendo aproximadamente 5°C menores que o ponto de fusão térmica (T_m) para a sequência específica e seu complemento em uma força iônica e um pH definidos. Entretanto, condições rigorosamente estridentes podem utilizar uma hibridização e/ou uma lavagem a 1, 2, 3 ou 4°C abaixo do ponto de fusão térmica (T_m); as condições moderadamente estridentes podem utilizar uma hibridi-

zação e/ou uma lavagem a 6, 7, 8, 9 ou 10°C abaixo do ponto de fusão térmica (T_m); as condições de estringência baixa podem utilizar uma hibridização e/ou uma lavagem a 11, 12, 13, 14, 15 ou 20°C abaixo do ponto de fusão térmica (T_m). Utilizando a equação, as composições de hibridização e de lavagem e a T_m desejada, os peritos comuns entenderão que variações na estringência das soluções de hibridização e/ou de lavagem estão descritas inerentemente. Se o grau desejado de pareamento errado resultar em uma T_m menor que 45°C (solução aquosa) ou 32°C (solução de formamida), é preferido aumentar a concentração de SSC de forma que uma temperatura mais alta possa ser utilizada. Um guia extensivo para a hibridização de ácidos nucleicos é encontrado em Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Parte I, Capítulo 2 (Elsevier, New York); e Ausubel e outros, eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 2 (Greene Publishing e Wiley-Interscience, New York). Ver Sambrook e outros (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

Proteínas Isoladas e Variantes e Fragmentos das Mesmas

As proteínas de delta-endotoxina são também abrangidas dentro da presente invenção. Por "proteína de delta-endotoxina" pretende-se uma proteína que possui a sequência de aminoácidos apresentada nas SEQ ID NO: 61-121 e 133-141. Fragmentos, porções biologicamente ativas e variantes das mesmas são também fornecidos e podem ser utilizados para a prática dos métodos da presente invenção.

"Fragmentos" ou "porções biologicamente ativas" incluem fragmentos de polipeptídeos que compreendem sequências de aminoácidos suficientemente idênticas à sequência de aminoácidos apresentada em qualquer uma das SEQ ID NO: 61-121 e 133-141 e que exibem atividade pesticida. Uma porção biologicamente ativa de uma proteína de delta-endotoxina pode ser um polipeptídeo que possui, por exemplo, 10, 25, 50, 100 ou mais aminoácidos de comprimento. Tais porções biologicamente ativas podem ser preparadas através de técnicas recombinantes e avaliadas em relação à ati-

vidade pesticida. Os métodos para medir a atividade pesticida são bem conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Czapla e Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews e outros (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone e outros (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293; e Patente U.S. Nº 5.743.477, dos quais todos são incorporados aqui como referência em sua totalidade. Como utilizado aqui, um fragmento compreende pelo menos 8 aminoácidos contíguos das SEQ ID NO: 61-121 e 133-141. A invenção abrange outros fragmentos, entretanto, tal como qualquer fragmento na proteína maior que aproximadamente 10, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250 ou 1300 aminoácidos.

Por "variantes" pretendem-se proteínas ou polipeptídeos que possuem uma sequência de aminoácidos que é pelo menos aproximadamente 60%, 65%, aproximadamente 70%, 75%, aproximadamente 80%, 85%, aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NO: 61-121 e 133-141. As variantes incluem ainda polipeptídeos codificados por uma molécula de ácido nucleico que se hibridiza com a molécula de ácido nucleico das SEQ ID NO: 1-60 e 124-132 ou um complemento das mesmas, sob condições estridentes. As variantes incluem polipeptídeos que diferem na sequência de aminoácidos devido à mutagênese. As proteínas variantes abrangidas pela presente invenção são biologicamente ativas, o que significa que continuam a possuir a atividade biológica desejada da proteína nativa, isto é, mantêm a atividade pesticida. Os métodos para medir a atividade pesticida são bem conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Czapla e Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews e outros (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone e outros (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293; e Patente U.S. Nº 5.743.477, dos quais todos são incorporados aqui como referência em sua totalidade.

Genes bacterianos, tais como os genes *axmi* desta invenção, possuem muito frequentemente vários códons de início de metionina em proximidade com o início do quadro aberto de leitura. Frequentemente, o

início da tradução em um ou mais destes códons de início levará à produção de uma proteína funcional. Estes códons de início podem incluir os códons ATG. Entretanto, bactérias tal como *Bacillus sp.* também reconhecem o códon GTG como um códon de início e proteínas que iniciam a tradução nos

5 códons GTG contêm uma metionina no primeiro aminoácido. Além disso, não é frequentemente determinado *a priori* quais destes códons são utilizados naturalmente na bactéria. Assim, é entendido que o uso de um dos códons de metionina alternativos também pode levar à produção de proteínas de delta-endotoxina que codificam atividade pesticida. Estas proteínas de

10 delta-endotoxina são abrangidas na presente invenção e podem ser utilizadas nos métodos da presente invenção.

Anticorpos para os polipeptídeos da presente invenção ou para variantes ou fragmentos dos mesmos, também são abrangidos. Os métodos para a produção de anticorpos são bem conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Harlow e Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; Patente U.S. Nº 4.196.265).

15

Variantes Alteradas ou Melhoradas

É reconhecido que sequências de DNA de uma delta-endotoxina podem ser alteradas através de vários métodos e que estas alterações podem resultar em sequências de DNA que codificam proteínas com sequências de aminoácidos diferentes das codificadas por uma delta-endotoxina da presente invenção. Esta proteína pode ser alterada de várias maneiras incluindo substituições, deleções, truncamentos e inserções de aminoácidos de um ou mais aminoácidos das SEQ ID NO: 61-121 e 133-141, incluindo até

20

25 aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 100, aproximadamente 105,

30

aproximadamente 110, aproximadamente 115, aproximadamente 120, aproximadamente 125, aproximadamente 130 ou mais substituições, deleções ou inserções de aminoácidos.

Os métodos para tais manipulações são geralmente conhecidos na técnica. Por exemplo, variantes de sequências de aminoácidos de uma proteína de delta-endotoxina podem ser preparadas por mutações no DNA. Isto também pode ser realizado através de uma de várias formas de mutagênese e/ou na evolução direcionada. Em alguns aspectos, as modificações codificadas na sequência de aminoácidos não irão afetar substancialmente a função da proteína. Tais variantes possuirão a atividade pesticida desejada. Entretanto, é entendido que a capacidade de uma delta-endotoxina de conferir atividade pesticida pode ser aprimorada através do uso de tais técnicas sobre as composições desta invenção. Por exemplo, pode-se expressar uma delta-endotoxina em células hospedeiras que exibem altas taxas de incorporação errada de bases durante a replicação do DNA, tal como XL-1 Red (Stratagene). Após a propagação em tais cepas, pode-se isolar o DNA da delta-endotoxina (por exemplo, através da preparação do DNA plasmideal ou através da amplificação pela PCR e clonagem do fragmento de PCR resultante em um vetor), cultivar as mutações de delta-endotoxina em uma cepa não mutagênica e identificar os genes mutados da delta-endotoxina com atividade pesticida, por exemplo, através da realização de um ensaio para testar a atividade pesticida. Geralmente, a proteína é misturada e utilizada em ensaios de alimentação. Ver, por exemplo, Marrone e outros (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293. Tais ensaios podem incluir o contato de plantas com uma ou mais pragas e a determinação da capacidade da planta de sobreviver e/ou causar a morte das pragas. Os exemplos de mutações que resultam em maior toxicidade são encontrados em Schnepf e outros (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775-806.

Alternativamente, podem ser feitas alterações na sequência de proteína de muitas proteínas no terminal amino ou carbóxi sem afetar substancialmente a atividade. Isto pode incluir inserções, deleções ou alterações introduzidas por métodos moleculares modernos, tal como a PCR, incluindo

amplificações pela PCR que alteram ou estendem a sequência codificadora da proteína em virtude da inclusão de sequências codificadoras de aminoácidos nos oligonucleotídeos utilizados na amplificação pela PCR. Alternativamente, as sequências de proteínas adicionadas podem incluir sequências codificadoras de proteína inteiras, tais como aquelas comumente utilizadas na técnica para gerar fusões de proteínas. Tais proteínas de fusão são frequentemente utilizadas para (1) aumentar a expressão de uma proteína de interesse (2) introduzir um domínio de ligação, atividade enzimática ou epítopo para facilitar a purificação de proteína, a detecção de proteína ou outros usos experimentais conhecidos na técnica (3) direcionar a secreção ou a tradução de uma proteína para uma organela subcelular, tal como o espaço periplasmático de bactérias Gram-negativas ou o retículo endoplasmático de células eucarióticas, dos quais o último resulta frequentemente na glicosilação da proteína.

As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos variantes da presente invenção abrangem ainda sequências derivadas de procedimentos mutagênicos e recombinogênicos tal como o embaralhamento de DNA. Com tal procedimento, uma ou mais regiões codificadoras de proteínas de delta-endotoxina diferentes podem ser utilizadas para criar uma nova proteína de delta-endotoxina que possui as propriedades desejadas. Desta maneira, bibliotecas de polinucleotídeos recombinantes são geradas partindo de uma população de polinucleotídeos com sequências relacionadas compreendendo regiões de sequência que possuem identidade de sequência substancial e podem ser recombinadas de forma homóloga *in vitro* ou *in vivo*. Por exemplo, através da utilização desta abordagem, os motivos de sequência que codificam um domínio de interesse podem ser embaralhados entre um gene da delta-endotoxina da invenção e outros genes da delta-endotoxina conhecidos para a obtenção de um novo gene que codifica uma proteína com uma propriedade de interesse aprimorada, tal como uma maior atividade inseticida. As estratégias para tal embaralhamento de DNA são conhecidas na técnica. Ver, por exemplo, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370:389-391; Cramer e outros

(1997) *Nature Biotech.* 15:436-438; Moore e outros (1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347; Zhang e outros (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Cramer e outros (1998) *Nature* 391:288-291; e Patentes U.S. N^{os} 5.605.793 e 5.837.458.

5 A permuta ou o embaralhamento de domínios é outro mecanismo para a produção de proteínas de delta-endotoxina alteradas. Os domínios II e III podem sofrer permutas entre as proteínas de delta-endotoxina, resultando em toxinas híbridas ou quiméricas com maior atividade pesticida ou espectro-alvo. Os métodos para a produção de proteínas recombinantes e para o teste das mesmas em relação à atividade pesticida são bem conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Naimov e outros (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5328-5330; de Maagd e outros (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1537-1543; Ge e outros (1991) *J. Biol. Chem.* 266:17954-17958; Schnepf e outros (1990) *J. Biol. Chem.* 265:20923-20930; Rang e outros (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2918-2925).

Vetores

Uma sequência de delta-endotoxina da invenção pode ser fornecida em um cassete de expressão para a expressão em uma planta de interesse. Por "cassete de expressão de planta" pretende-se um construto de DNA que é capaz de resultar na expressão de uma proteína partindo de um quadro aberto de leitura em uma célula vegetal. Tipicamente este contém um promotor e uma sequência codificadora. Frequentemente, tais construtos conterão ainda uma região não traduzida 3'. Tais construtos podem conter uma "sequência sinal" ou uma "sequência líder" para facilitar o transporte cotradução ou pós-tradução do peptídeo para certas estruturas intracelulares tal como o cloroplasto (ou outro plastídeo), o retículo endoplasmático ou o complexo de Golgi.

Por "sequência sinal" pretende-se uma sequência que é conhecida ou suspeita de resultar no transporte de peptídeos cotradução ou pós-tradução através da membrana celular. Em eucariotos, isto envolve tipicamente a secreção dentro do aparelho de Golgi, com alguns resultando na glicosilação. Por "sequência líder" pretende-se qualquer sequência que

quando traduzida, resulta em uma sequência de aminoácidos suficiente para ativar o transporte cotradução da cadeia peptídica para uma organela subcelular. Assim, esta inclui sequências líderes que direcionam o transporte e/ou a glicosilação através da passagem para dentro do retículo endoplasmático, da passagem para vacúolos, plastídeos incluindo cloroplastos, mitocôndrias e similares.

Por "vetor de transformação de plantas" pretende-se uma molécula de DNA que é necessária para a transformação eficiente de uma célula vegetal. Tal molécula pode consistir em um ou mais cassetes de expressão de plantas e pode ser organizada em mais de uma molécula de DNA de "vetor". Por exemplo, os vetores binários são vetores de transformação de plantas que utilizam dois vetores de DNA não contíguos para codificar todas as funções que atuam em cis e em trans necessárias para a transformação de células vegetais (Hellens e Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5:446-451). "Vetor" refere-se a um construto de ácido nucleico planejado para transferência entre células hospedeiras diferentes. "Vetor de expressão" refere-se a um vetor que possui a capacidade de incorporar, integrar e expressar sequências de DNA heterólogas ou fragmentos em uma célula estranha. O cassete incluirá sequências reguladoras 5' e 3' ligadas de forma operacional a uma sequência da invenção. Por "ligado(a) de forma operacional" pretende-se uma ligação funcional entre um promotor e uma segunda sequência, em que a sequência promotora inicia e medeia a transcrição da sequência de DNA que corresponde à segunda sequência. Geralmente, ligado(a) de forma operacional significa que as sequências de ácidos nucleicos que estão ligadas são contíguas e, quando necessário unir duas regiões codificadoras de proteínas, contíguas e no mesmo quadro de leitura. O cassete pode conter adicionalmente pelo menos um gene adicional que será cotransformado no organismo. Alternativamente, o(s) gene(s) adicional(is) pode(m) ser fornecido(s) em vários cassetes de expressão.

"Promotor" refere-se a uma sequência de ácido nucleico que funciona para direcionar a transcrição de uma sequência codificadora a jusante. O promotor junto com outras sequências de ácidos nucleicos regula-

doras da transcrição e da tradução (também denominadas "sequências de controle") é necessário para a expressão de uma sequência de DNA de interesse.

5 Tal cassete de expressão é fornecido com um grande número de sítios de restrição para a inserção da sequência de delta-endotoxina que está sob a regulação transcricional das regiões reguladoras.

O cassete de expressão incluirá na direção 5'-3' da transcrição, uma região iniciadora da transcrição e da tradução (isto é, um promotor), uma sequência de DNA da invenção e uma região de término da tradução e da transcrição (isto é, região de término) funcional em plantas. O promotor
10 pode ser nativo ou análogo ou estranho ou heterólogo, ao hospedeiro vegetal e/ou à sequência de DNA da invenção. Adicionalmente, o promotor pode ser a sequência natural ou alternativamente uma sequência sintética. Quando o promotor for "nativo" ou "homólogo" ao hospedeiro vegetal, é pretendi-
15 do que o promotor seja encontrado na planta nativa na qual o promotor é introduzido. Quando o promotor for "estranho" ou "heterólogo" à sequência de DNA da invenção, é pretendido que o promotor não seja o promotor nativo ou que ocorre naturalmente para a sequência de DNA ligada de forma operacional da invenção.

20 A região de término pode ser nativa em relação à região de início da transcrição, pode ser nativa em relação à sequência de DNA ligada de forma operacional de interesse, pode ser nativa em relação ao hospedeiro vegetal ou pode ser derivada de uma outra fonte (isto é, estranha ou heteróloga ao promotor, à sequência de DNA de interesse, ao hospedeiro vegetal
25 ou qualquer combinação dos mesmos). As regiões de término convenientes estão disponíveis no plasmídeo Ti de *A. tumefaciens*, tais como as regiões de término da octopina sintase e da nopalina sintase. Ver também Guerineau e outros (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262:141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64:671-674; Sanfacon e outros (1991) *Genes Dev.* 5:141-149; Mogen e outros (1990) *Plant Cell* 2:1261-1272; Munroe e outros (1990) *Gene* 91:151-158; Ballas e outros (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7891-7903; e Joshi e outros (1987) *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639.

Quando apropriado, o(s) gene(s) pode(m) ser otimizado(s) para maior expressão na célula hospedeira transformada. Isto é, os genes podem ser sintetizados utilizando códons preferidos pela célula hospedeira para maior expressão ou podem ser sintetizados utilizando códons em uma frequência de uso de códons preferida pelo hospedeiro. Geralmente, o conteúdo de GC do gene será aumentado. Ver, por exemplo, Campbell e Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92:1-11 para uma discussão de uso de códons preferidos pelo hospedeiro. Estão disponíveis na técnica os métodos para a síntese de genes preferidos pelas plantas. Ver, por exemplo, as Patentes U.S. N^{os} 5.380.831 e 5.436.391 e Murray e outros (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498, incorporados aqui por referência.

Em uma modalidade, a delta-endotoxina é direcionada para o cloroplasto para expressão. Desta maneira, quando a delta-endotoxina não for inserida diretamente no cloroplasto, o cassete de expressão conterá adicionalmente um ácido nucleico que codifica um peptídeo de trânsito para direcionar a delta-endotoxina para os cloroplastos. Tais peptídeos de trânsito são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Von Heijne e outros (1991) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:104-126; Clark e outros (1989) *J. Biol. Chem.* 264:17544-17550; Della-Cioppa e outros (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968; Romer e outros (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:1414-1421; e Shah e outros (1986) *Science* 233:478-481.

O gene da delta-endotoxina que será direcionado para o cloroplasto pode ser otimizado para expressão no cloroplasto para ser responsável por diferenças no uso de códons entre o núcleo vegetal e esta organela. Desta maneira, os ácidos nucleicos de interesse podem ser sintetizados utilizando códons preferidos pelo cloroplasto. Ver, por exemplo, a Patente U.S. N^o 5.380.831, incorporada aqui por referência.

Transformação de Plantas

Os métodos da invenção envolvem a introdução de um construto de nucleotídeos em uma planta. Por "introdução" pretende-se apresentar à planta o construto de nucleotídeos de tal maneira que o construto ganhe acesso ao interior de uma célula da planta. Os métodos da invenção não re-

querem que um método particular para a introdução de um construto de nucleotídeos em uma planta seja utilizado, apenas que o construto de nucleotídeos ganhe acesso ao interior de pelo menos uma célula da planta. Os métodos para a introdução de construtos de nucleotídeos nas plantas são conhecidos na técnica incluindo, mas não limitados a, métodos de transformação estável, métodos de transformação transitória e métodos mediados por vírus.

Por "planta" pretendem-se plantas inteiras, órgãos de plantas (por exemplo, folhas, caules, raízes etc.), sementes, células vegetais, propágulos, embriões e progênie das mesmas. As células vegetais podem ser diferenciadas ou não diferenciadas (por exemplo, calo, células em cultura em suspensão, protoplastos, células da folha, células da raiz, células de floema, pólen).

"Plantas transgênicas" ou "plantas transformadas" ou plantas ou células ou tecidos "transformados de forma estável" referem-se a plantas que incorporaram ou integraram sequências de ácidos nucleicos ou fragmentos de DNA exógenos na célula vegetal. Estas sequências de ácidos nucleicos incluem aquelas que são exógenas ou não estão presentes na célula vegetal não transformada, bem como aquelas que podem ser endógenas ou presentes na célula vegetal não transformada. "Heterólogas" geralmente refere-se às sequências de ácidos nucleicos que não são endógenas à célula ou parte do genoma nativo em que estão presentes e foram adicionadas na célula através de infecção, transfecção, microinjeção, eletroporação, microprojecção ou similar.

A transformação de células vegetais pode ser realizada através de uma de várias técnicas conhecidas na técnica. O gene da delta-endotoxina da invenção pode ser modificado para a obtenção ou para aumentar a expressão em células vegetais. Tipicamente uma construção que expressa tal uma proteína conteria um promotor para controlar a transcrição do gene, bem como uma região não traduzida 3' para permitir o término da transcrição e a poliadenilação. A organização de tais construções é bem conhecida na técnica. Em alguns casos, pode ser útil engenheirar o gene de

forma que o peptídeo resultante seja secretado ou direcionado de outra maneira para dentro da célula vegetal. Por exemplo, o gene pode ser engenheirado para conter um peptídeo sinal para facilitar a transferência do peptídeo para o retículo endoplasmático. Também pode ser preferível engenheirar o cassete de expressão de planta para conter um íntron, de forma que o processamento do íntron no mRNA seja necessário para expressão.

Tipicamente este "cassete de expressão de planta" será inserido em um "vetor de transformação de plantas". Este vetor de transformação de plantas pode ser compreendido de um ou mais vetores de DNA necessários para conseguir a transformação das plantas. Por exemplo, é uma prática comum na técnica utilizar vetores de transformação de plantas que são compreendidos de mais de um segmento de DNA contíguo. Estes vetores são frequentemente referidos na técnica como "vetores binários". Os vetores binários bem como os vetores com plasmídeos auxiliares são mais frequentemente utilizados para transformação mediada por *Agrobacterium*, quando o tamanho e a complexidade dos segmentos de DNA necessários para atingir uma transformação eficiente são bastante grandes é vantajoso separar as funções em moléculas de DNA separadas. Os vetores binários contêm tipicamente um vetor plasmideal que contém as sequências que atuam em cis necessárias para a transferência do T-DNA (tais como a borda esquerda e a borda direita), um marcador que pode ser selecionado, que é engenheirado para ser capaz de ser expresso em uma célula vegetal e um "gene de interesse" (um gene engenheirado para ser capaz de ser expresso em uma célula vegetal para a qual a produção de plantas transgênicas é desejada). Também estão presentes neste vetor plasmideal as sequências necessárias para a replicação de bactérias. As sequências que atuam em cis são dispostas de uma maneira que permita a transferência eficiente para dentro das células vegetais e a expressão nas mesmas. Por exemplo, o gene marcador que pode ser selecionado e a delta-endotoxina ficam localizados entre as bordas esquerda e direita. Frequentemente um segundo vetor plasmideal contém os fatores que atuam em trans que medeiam a transferência do T-DNA de *Agrobacterium* para as células vegetais. Este plasmídeo

contém frequentemente as funções de virulência (genes Vir) que permitem a infecção das células vegetais por *Agrobacterium* e a transferência do DNA através da clivagem nas sequências de borda e a transferência de DNA mediada por vir, como é entendido na técnica (Hellens e Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5:446-451). Vários tipos de cepas de *Agrobacterium* (por exemplo, LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105 etc.) podem ser utilizados para a transformação de plantas. O segundo vetor plasmideal não é necessário para a transformação das plantas através de outros métodos tais como microprojeção, microinjeção, eletroporação, polietileno glicol, etc.

Em geral, os métodos de transformação de plantas envolvem a transferência do DNA heterólogo para dentro das células vegetais alvo (por exemplo, embriões imaturos ou maduros, culturas em suspensão, calo não diferenciado, protoplastos etc.), seguida pela aplicação de um nível limite máximo de seleção apropriada (dependendo do gene marcador que pode ser selecionado) para recuperar as células vegetais transformadas de um grupo de massa celular não transformada. Os explantes são tipicamente transferidos para um suprimento fresco do mesmo meio e cultivados repetidamente. Subsequentemente, as células transformadas são diferenciadas em brotos após colocar no meio de regeneração suplementado com um nível limite máximo de agente de seleção. Os brotos são então transferidos para um meio de enraizamento seletivo para a recuperação do broto enraizado ou da plantícula. A plantícula transgênica então cresce em uma planta madura e produz sementes férteis (por exemplo, Hiei e outros (1994) *The Plant Journal* 6:271-282; Ishida e outros (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750). Os explantes são tipicamente transferidos para um suprimento fresco do mesmo meio e cultivados repetidamente. Uma descrição geral das técnicas e dos métodos para gerar plantas transgênicas é encontrada em Ayres e Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13:219-239 e Bommineni e Jauhar (1997) *Maydica* 42:107-120. Uma vez que o material transformado contém muitas células; tanto as células transformadas quanto as não transformadas estão presentes em qualquer pedaço do calo ou do tecido ou do grupo de células alvo submetido. A capacidade de matar células não

transformadas e de permitir que as células transformadas se proliferem resulta em culturas de plantas transformadas. Frequentemente, a capacidade de remover as células não transformadas é uma limitação para a recuperação rápida de células vegetais transformadas e a produção bem sucedida de plantas transgênicas.

Os protocolos de transformação bem como os protocolos para a introdução de sequências de nucleotídeos nas plantas podem variar dependendo do tipo de planta ou célula vegetal, isto é, monocotiledônea ou dicotiledônea, direcionada para a transformação. A produção de plantas transgênicas pode ser realizada através de um de vários métodos, incluindo, mas não limitados a, microinjeção, eletroporação, transferência gênica direta, introdução de DNA heterólogo por *Agrobacterium* nas células vegetais (transformação mediada por *Agrobacterium*), bombardeio de células vegetais com DNA estranho heterólogo aderido a partículas, aceleração balística de partículas, transformação com feixes de aerossol (Pedido de Patente U.S. Publicado No. 20010026941; Patente U.S. Nº 4.945.050; Publicação Internacional No. WO 91/00915; Pedido de Patente U.S. Publicado No. 2002015066), transformação de Lec1 e vários outros métodos mediados por direcionamento de não partículas para a transferência do DNA.

Os métodos para transformação de cloroplastos são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Svab e outros (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8526-8530; Svab e Maliga (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:913-917; Svab e Maliga (1993) *EMBO J.* 12:601-606. O método se baseia no fornecimento por pistola de partículas de DNA contendo um marcador que pode ser selecionado e no direcionamento do DNA para o genoma do plastídeo através de recombinação homóloga. Adicionalmente, a transformação de plastídeos pode ser realizada através da transativação de um transgene carregado por plastídeo silencioso através da expressão preferida para o tecido de uma RNA polimerase codificada pelo núcleo e direcionada para o plastídeo. Tal sistema foi relatado em McBride e outros (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7301-7305.

Após a integração do DNA estranho heterólogo nas células ve-

getais, pode-se então aplicar um nível limite máximo de seleção apropriada no meio para matar as células não transformadas e separar e proliferar as células supostamente transformadas que sobrevivem a este tratamento de seleção através da transferência de forma regular para um meio fresco. Para a passagem e o desafio contínuos com esta seleção apropriada, pode-se identificar e proliferar as células que são transformadas com o vetor plasmidial. Métodos moleculares e bioquímicos podem ser então utilizados para confirmar a presença do gene de interesse heterólogo integrado no genoma da planta transgênica.

As células que foram transformadas podem ser crescidas em plantas de acordo com maneiras convencionais. Ver, por exemplo, McCormick e outros (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Estas plantas podem então ser crescidas e polinizadas com a mesma linhagem transformada ou com linhagens diferentes e o híbrido resultante que possui expressão constitutiva da característica fenotípica desejada pode ser identificado. Duas ou mais gerações podem ser crescidas para garantir que a expressão da característica fenotípica desejada é mantida de forma estável e herdada e então as sementes são colhidas para garantir que a expressão da característica fenotípica desejada seja conseguida. Desta maneira, a presente invenção fornece semente transformada (também referida como "semente transgênica") que possui uma construção de nucleotídeos da invenção, por exemplo, um cassete de expressão da invenção, incorporado de forma estável em seu genoma.

Avaliação da Transformação de Plantas

Após a introdução de DNA estranho heterólogo nas células vegetais, a transformação ou a integração do gene heterólogo no genoma da planta é confirmada através de vários métodos tal como a análise de ácidos nucleicos, proteínas e metabólitos associados ao gene integrado.

A análise de PCR é um método rápido para verificar as células, tecido ou brotos transformados em relação à presença do gene incorporado no estágio mais inicial antes do transplante para o solo (Sambrook e Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Labora-

tory Press, Cold Spring Harbor, NY). A PCR é realizada utilizando iniciadores de oligonucleotídeos específicos para o gene de interesse ou fundo de vetor de *Agrobacterium*, etc.

5 A transformação da planta pode ser confirmada através da análise de Southern blot do DNA genômico (Sambrook e Russell, 2001, *supra*). Em geral, o DNA total é extraído do transformante, digerido com enzimas de restrição apropriadas, fracionado em um gel de agarose e transferido para uma membrana de nitrocelulose ou de náilon. A membrana ou "blot" é então submetido ao tratamento com sonda com, por exemplo, fragmento de DNA
10 alvo radiomarcado com ^{32}P para confirmar a integração do gene introduzido no genoma da planta de acordo com técnicas-padrão (Sambrook e Russell, 2001, *supra*).

Na análise de Northern blot, o RNA é isolado dos tecidos específicos do transformante, fracionado em um gel de agarose com formaldeído e
15 "blotted" sobre um filtro de náilon de acordo com procedimentos padronizados que são utilizados rotineiramente na técnica (Sambrook e Russell, 2001, *supra*). A expressão do RNA codificado pela delta-endotoxina é então testada através da hibridização do filtro com uma sonda radioativa derivada de uma delta-endotoxina, através de métodos conhecidos na técnica (Sambrook
20 ok e Russell, 2001, *supra*).

Os ensaios de Western blot, bioquímicos e similares podem ser realizados nas plantas transgênicas para confirmar a presença da proteína codificada pelo gene da delta-endotoxina através de procedimentos padronizados (Sambrook e Russell, 2001, *supra*) utilizando anticorpos que se ligam
25 a um ou mais epitopos presentes na proteína de delta-endotoxina.

Atividade Pesticida em Plantas

Em outro aspecto da invenção, podem ser geradas plantas transgênicas que expressam uma delta-endotoxina que possui atividade pesticida. Os métodos descritos anteriormente com a finalidade de exemplo
30 podem ser utilizados para gerar plantas transgênicas, mas a maneira em que as células vegetais transgênicas são geradas não é crítica para esta invenção. Os métodos conhecidos ou descritos na técnica tais como a trans-

formação mediada por *Agrobacterium*, a transformação biolística e os métodos não mediados por partículas podem ser utilizados a critério do indivíduo que conduz o experimento. As plantas que expressam uma delta-endotoxina podem ser isoladas através de métodos comuns descritos na técnica, por exemplo, através da transformação de calo, da seleção de calo transformado e da regeneração de plantas férteis partindo de tal calo transgênico. Em tal método, pode-se utilizar qualquer gene como um marcador que pode ser selecionado contanto que sua expressão nas células vegetais confira capacidade de identificar ou selecionar células transformadas.

Um número de marcadores foi desenvolvido para uso com células vegetais, tais como resistência ao cloranfenicol, ao aminoglicosídeo G418, à higromicina ou similar. Outros genes que codificam um produto envolvido no metabolismo do cloroplasto também podem ser utilizados como marcadores que podem ser selecionados. Por exemplo, os genes que fornecem resistência a herbicidas para plantas tais como glifosato, bromoxinila ou imidazolinona podem encontrar uso particular. Tais genes foram relatados (Stalker e outros (1985) *J. Biol. Chem.* 263:6310-6314 (gene de nitrilase de resistência à bromoxinila); e Sathasivan e outros (1990) *Nucl. Acids Res.* 18:2188 (gene de resistência a AHAS imidazolinona). Adicionalmente, os genes divulgados aqui são úteis como marcadores para avaliar a transformação de células bacterianas ou vegetais. Os métodos para a detecção da presença de um transgene em uma planta, um órgão de planta (por exemplo, folhas, caules, raízes etc.), uma semente, uma célula vegetal, um propágulo, um embrião ou uma progênie da mesma são bem conhecidos na técnica. Em uma modalidade, a presença do transgene é detectada através do teste da atividade pesticida.

As plantas férteis que expressam uma delta-endotoxina podem ser testadas em relação à atividade pesticida e as plantas que exibem atividade ótima são selecionadas para cruzamento adicional. Estão disponíveis na técnica os métodos para analisar a atividade para pragas. Geralmente, a proteína é misturada e utilizada em ensaios de alimentação. Ver, por exemplo, Marrone e outros (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293.

A presente invenção pode ser utilizada para a transformação de qualquer espécie de planta, incluindo, mas não limitada a, monocotiledôneas e dicotiledôneas. Os exemplos de plantas de interesse incluem, mas não estão limitados a, milho, sorgo, trigo, girassol, tomate, crucíferas, pimentas, batata, algodão, arroz, soja, beterraba, cana-de-açúcar, tabaco, cevada e semente oleosa de colza, *Brassica* sp., alfafa, centeio, painço, açafroa, amendoins, batata doce, mandioca, café, coco, abacaxi, árvores de frutos cítricos, cacau, chá, banana, abacate, figo, goiaba, manga, azeitona, papaia, caju, macadâmia, amêndoa, aveia, vegetais, plantas ornamentais e coníferas.

Os vegetais incluem, mas não estão limitados a, tomates, alface, ervilha verde, feijão de lima, ervilhas e membros do gênero *Curcumis* tais como pepino, cantaloupo e meloa. As plantas ornamentais incluem, mas não estão limitadas a, azaleia, hortênsia, hibisco, rosas, tulipas, narcisos, petúnias, cravo, copo-de-leite e crisântemo. Preferencialmente, as plantas da presente invenção são plantas de cultivo (por exemplo, milho, sorgo, trigo, girassol, tomate, crucíferas, pimentas, batata, algodão, arroz, soja, beterraba de açúcar, cana de açúcar, tabaco, cevada, semente oleosa de colza etc.).

Uso no Controle de Pragas

Os métodos gerais para empregar linhagens que compreendem uma sequência de nucleotídeos da presente invenção ou uma variante da mesma, no controle pesticida ou na engenharia de outros organismos como agentes pesticidas são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, a Patente U.S. Nº 5.039.523 e a EP 0480762A2.

As cepas de *Bacillus* que contêm uma sequência de nucleotídeos da presente invenção ou uma variante da mesma ou os micro-organismos que foram alterados geneticamente para conterem um gene e uma proteína pesticida podem ser utilizados para a proteção de plantas de cultivo e produtos agrícolas das pragas. Em um aspecto da invenção, células inteiras, isto é, não lisadas de um organismo que produz toxina (pesticida) são tratadas com reagentes que prolonga a atividade da toxina produzida na célula quando a célula é aplicada no ambiente da(s) praga(s)-alvo.

Alternativamente, o pesticida é produzido através da introdução de um gene da delta-endotoxina em um hospedeiro celular. A expressão do gene da delta-endotoxina resulta, diretamente ou indiretamente, na produção e na manutenção intracelular do pesticida. Em um aspecto desta invenção, estas células são então tratadas sob condições que prolongam a atividade da toxina produzida na célula quando a célula é aplicada no ambiente da(s) praga(s)-alvo. O produto resultante mantém a toxicidade da toxina. Estes pesticidas naturalmente encapsulados podem então ser formulados de acordo com técnicas convencionais para aplicação no ambiente que hospeda uma praga alvo, por exemplo, solo, água e folhagem de plantas. Ver, por exemplo, EPA 0192319 e as referências citadas ali. Alternativamente, podem ser formuladas as células que expressam um gene desta invenção de forma a permitir a aplicação do material resultante como um pesticida.

Composições Pesticidas

Os ingredientes ativos da presente invenção são normalmente aplicados na forma de composições e podem ser aplicados na área de cultivo ou na planta que será tratada, simultaneamente ou em sequência, a outros compostos. Estes compostos podem ser fertilizantes, agentes que matam ervas daninhas, crioprotetores, tensoativos, detergentes, sabões pesticidas, óleos inertes, polímeros e/ou formulações carreadoras de liberação controlada ou biodegradáveis que permitem a dosagem em longo prazo de uma área-alvo após uma única aplicação da formulação. Estes também podem ser herbicidas seletivos, inseticidas químicos, agentes que destroem vírus, microbicidas, amebicidas, pesticidas, fungicidas, bacteriocidas, nematocidas, moluscicidas ou misturas de várias destas preparações, se desejado, junto com veículos, tensoativos ou agentes que promovem a aplicação aceitáveis na agricultura empregados de forma costumeira na técnica da formulação. Os veículos e os adjuvantes adequados podem ser sólidos ou líquidos e correspondem às substâncias comumente empregadas na tecnologia de formulação, por exemplo, substâncias minerais naturais ou regeneradas, solventes, dispersantes, agentes umectantes, agentes de pegajosidade, aglutinantes ou fertilizantes. Similarmente as formulações podem ser

preparadas em "iscas" comestíveis ou elaboradas em "armadilhas" para pragas para permitir a alimentação ou a ingestão por uma praga-alvo da formulação pesticida.

Os métodos de aplicação de um ingrediente ativo da presente invenção ou uma composição agroquímica da presente invenção que contém pelo menos uma das proteínas pesticidas produzidas pelas cepas bacterianas da presente invenção incluem aplicação nas folhas, revestimento das sementes e aplicação no solo. O número de aplicações e a taxa de aplicação dependem da intensidade de infestação pela praga correspondente.

A composição pode ser formulada na forma de um pó, uma poeira, um pélete, um grânulo, um spray, uma emulsão, um coloide, uma solução ou similar e pode ser preparada através de meios convencionais tais como dessecação, liofilização, homogeneização, extração, filtração, centrifugação, sedimentação ou concentração de uma cultura de células que compreende o polipeptídeo. Em todas as tais composições que contêm pelo menos um tal polipeptídeo pesticida, o polipeptídeo pode estar presente em uma concentração de aproximadamente 1% até aproximadamente 99% em peso.

As pragas de lepidóptero, coleóptero ou nematoide podem ser mortas ou reduzidas em números em certa área através dos métodos da invenção ou podem ser aplicadas de forma profilática em uma área ambiental para prevenir a infestação por uma praga susceptível. Preferencialmente a praga ingere ou é colocada em contato com uma quantidade pesticidamente pesticidamente eficiente polipeptídeo. Por "quantidade pesticidamente pesticidamente eficiente" pretende-se uma quantidade do pesticida que é capaz de provocar a morte de pelo menos uma praga ou de reduzir de forma visível o crescimento, a alimentação ou o desenvolvimento fisiológico normal da praga. Esta quantidade variará dependendo de fatores tais como, por exemplo, as pragas-alvo específicas que devem ser controladas, o ambiente específico, a localização, a planta, o local de cultivo ou agrícola que será tratado, as condições ambientais e o método, a taxa, a concentração, a estabilidade e a quantidade de aplicação da composição de polipeptídeo pesticidamente eficiente. As formulações também podem variar em relação

às condições climáticas, às considerações ambientais e/ou à frequência de aplicação e/ou à gravidade de infestação da praga.

As composições pesticidas descritas podem ser produzidas através da formulação da suspensão de células bacterianas, de cristais e/ou de esporos ou do componente de proteína isolado com o veículo aceitável na agricultura desejado. As composições podem ser formuladas antes da administração em uma forma apropriada tal como liofilizada, seca por congelamento, dessecada ou em um veículo, um meio ou um diluente adequado aquoso, tal como solução salina ou outro tampão. As composições formuladas podem estar na forma de uma poeira ou um material granular ou uma suspensão em óleo (vegetal ou mineral) ou água ou emulsões em óleo/água ou na forma de um pó que pode ser umedecido ou em combinação com qualquer outro material veículo adequado para a aplicação agrícola. Os veículos agrícolas adequados podem ser sólidos ou líquidos e são bem conhecidos na técnica. O termo "veículo aceitável na agricultura" cobre todos os adjuvantes, componentes inertes, dispersantes, tensoativos, agentes de pegajosidade, aglutinantes, etc. que são comumente utilizados na tecnologia de formulação de pesticidas; estes são bem conhecidos pelos versados na formulação de pesticidas. As formulações podem ser misturadas com um ou mais adjuvantes sólidos ou líquidos e preparadas através de vários meios, por exemplo, através de mistura homogênea, mescla e/ou trituração da composição pesticida com adjuvantes adequados utilizando técnicas de formulação convencionais. As formulações e os métodos de aplicação adequados são descritos na Patente U.S. Nº 6.468.523, incorporada aqui como referência.

"Praga" inclui, mas não está limitada a insetos, fungos, bactérias, nematoides, traças, carrapatos e similares. As pragas de insetos incluem insetos selecionados das ordens *Coleoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera*, *Lepidoptera*, *Mallophaga*, *Homoptera*, *Hemiptera*, *Orthoptera*, *Thysanoptera*, *Dermaptera*, *Isoptera*, *Anoplura*, *Siphonaptera*, *Trichoptera* etc., particularmente *Coleoptera*, *Lepidoptera* e *Diptera*.

A ordem *Coleoptera* inclui as subordens *Adephaga* e *Polyphaga*.

A subordem *Adephaga* inclui as superfamílias *Caraboidea* e *Gyrinoidea*, enquanto que a subordem *Polyphaga* inclui as superfamílias *Hydrophiloidea*, *Staphylinoidea*, *Cantharoidea*, *Cleroidea*, *Elateroidea*, *Dascilloidea*, *Dryopoidea*, *Byrrhoidea*, *Cucujoidea*, *Meloidea*, *Mordelloidea*, *Tenebrionoidea*, *Bostrichoidea*, *Scarabaeoidea*, *Cerambycoidea*, *Chrysomeloidea* e *Curculionoidea*. A superfamília *Caraboidea* inclui as famílias *Cicindelidae*, *Carabidae* e *Dytiscidae*. A superfamília *Gyrinoidea* inclui a família *Gyrinidae*. A superfamília *Hydrophiloidea* inclui a família *Hydrophilidae*. A superfamília *Staphylinoidea* inclui as famílias *Silphidae* e *Staphylinidae*. A superfamília *Cantharoidea* inclui as famílias *Cantharidae* e *Lampyridae*. A superfamília *Cleroidea* inclui as famílias *Cleridae* e *Dermestidae*. A superfamília *Elateroidea* inclui as famílias *Elateridae* e *Buprestidae*. A superfamília *Cucujoidea* inclui a família *Coccinellidae*. A superfamília *Meloidea* inclui a família *Meloidae*. A superfamília *Tenebrionoidea* inclui a família *Tenebrionidae*. A superfamília *Scarabaeoidea* inclui as famílias *Passalidae* e *Scarabaeidae*. A superfamília *Cerambycoidea* inclui a família *Cerambycidae*. A superfamília *Chrysomeloidea* inclui a família *Chrysomelidae*. A superfamília *Curculionoidea* inclui as famílias *Curculionidae* e *Scolytidae*.

A ordem *Diptera* inclui as subordens *Nematocera*, *Brachycera* e *Cyclorrhapha*. A subordem *Nematocera* inclui as famílias *Tipulidae*, *Psychodidae*, *Culicidae*, *Ceratopogonidae*, *Chironomidae*, *Simuliidae*, *Bibionidae* e *Cecidomyiidae*. A subordem *Brachycera* inclui as famílias *Stratiomyidae*, *Tabanidae*, *Therevidae*, *Asilidae*, *Mydidae*, *Bombyliidae* e *Dolichopodidae*. A subordem *Cyclorrhapha* inclui as divisões *Aschiza* e *Aschiza*. A divisão *Aschiza* inclui as famílias *Phoridae*, *Syrphidae* e *Conopidae*. A divisão *Aschiza* inclui as seções *Acalyptratae* e *Calypttratae*. A seção *Acalyptratae* inclui as famílias *Otitidae*, *Tephritidae*, *Agromyzidae* e *Drosophilidae*. A seção *Calypttratae* inclui as famílias *Hippoboscidae*, *Oestridae*, *Tachinidae*, *Anthomyiidae*, *Muscidae*, *Calliphoridae* e *Sarcophagidae*.

A ordem *Lepidoptera* inclui as famílias *Papilionidae*, *Pieridae*, *Lycaenidae*, *Nymphalidae*, *Danaidae*, *Satyridae*, *Hesperiidae*, *Sphingidae*, *Saturniidae*, *Geometridae*, *Arctiidae*, *Noctuidae*, *Lymantriidae*, *Sesiidae* e

Tineidae.

Os nematoides incluem nematoides parasitas tais como nematoides formadores de nós de raiz, de cistos e de lesões, incluindo *Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp. e *Globodera* spp.; particularmente membros dos nematoides formadores de cistos, incluindo, mas não limitados a, *Heterodera* 5 *glicinas* (nematóide de cisto da soja); *Heterodera schachtii* (nematóide de cisto da beterraba); *Heterodera avenae* (nematóide de cisto de cereais); e *Globodera rostochiensis* e *Globodera pallida* (nematoides formadores de cistos da batata). Os nematoides formadores de lesões incluem *Pratylen-* 10 *chus* spp.

As pragas de insetos da invenção para as plantas de cultivo principais incluem: Milho: *Ostrinia nubilalis*, broca do milho europeu; *Agrotis* 15 *ipsilon*, lagarta-rosca negra; *Helicoverpa zea*, lagarta da espiga de milho; *Spodoptera frugiperda*, lagarta militar cortadora; *Diatraea grandiosella*, broca do milho do sudoeste; *Elasmopalpus lignosellus*, broca do caule de milho inferior; *Diatraea saccharalis*, broca da cana de açúcar; *Diabrotica virgifera*, larva de raiz de milho do oeste; *Diabrotica longicornis barberi*, larva de raiz de milho do norte; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, larva de raiz de milho do sul; *Melanotus* spp., larvas arame; *Cyclocephala borealis*, northern 20 masked chafer (white grub); *Cyclocephala immaculata*, escaravelho mascarado do sul (lagarta branca); *Popillia japonica*, besouro japonês; *Chaetocnema pulicaria*, besouro saltador do milho; *Sphenophorus maidis*, pulgão do milho; *Rhopalosiphum maidis*, pulgão da folha do milho; *Anuraphis maidiradicis*, pulgão da raiz do milho; *Blissus leucopterus leucopterus*, percevejo de 25 trigais; *Melanoplus femurrubrum*, gafanhoto de pernas vermelhas; *Melanoplus sanguinipes*, gafanhoto migratório; *Hylemya platura*, larva de grão de milho; *Agromyza parvicornis*, minador foliar de mancha do milho; *Anaphotrips obscurus*, tripes de gramínea; *Solenopsis milesta*, formiga ladra; *Tetranychus urticae*, ácaro rajado; Sorgo: *Chilo partellus*, broca do sorgo; *Spodoptera frugiperda*, lagarta militar cortadora; *Helicoverpa zea*, lagarta da espiga de milho; *Elasmopalpus lignosellus*, broca do caule de milho inferior; *Feltia subterranea*, lagarta-rosca granulosa; *Phyllophaga crinita*, lagarta

- branca; *Eleodes*, *Conoderus* e *Aeolus* spp., larvas arame; *Oulema melanopus*, besouro de folha de cereais; *Chaetocnema pulicaria*, besouro saltador do milho; *Sphenophorus maidis*, pulgão do milho; *Rhopalosiphum maidis*; pulgão da folha do milho; *Sipha flava*, pulgão amarelo da cana de açúcar;
- 5 *Blissus leucopterus leucopterus*, percevejo de trigais; *Contarinia sorghicola*, mosquito-pólvora do sorgo; *Tetranychus cinnabarinus*, ácaro rajado carmim; *Tetranychus urticae*, ácaro rajado; Trigo: *Pseudaletia unipunctata*, lagarta de cereais; *Spodoptera frugiperda*, lagarta militar cortadora; *Elasmopalpus lignosellus*, broca do caule de milho inferior; *Agrotis orthogonia*, lagarta-rosca
- 10 do oeste; *Elasmopalpus lignosellus*, broca do caule de milho inferior; *Oulema melanopus*, besouro de folha de cereais; *Hypera punctata*, gorgulho de folha de trevo; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, larva de raiz de milho do sul; pulgão do trigo russo; *Schizaphis graminum*, pulgão verde; *Macrosiphum avenae*, pulgão de grão inglês; *Melanoplus femurrubrum*, gafanhoto de pernas vermelhas;
- 15 *Melanoplus diferentesialis*, gafanhoto diferencial; *Melanoplus sanguinipes*, gafanhoto migratório; *Mayetiola destructor*, mosca de Hesse; *Sitodiplosis mosellana*, mosquito-pólvora do trigo; *Meromyza americana*, larva de caule de trigo; *Hylemya coarctata*, mosca de bulbo do trigo; *Frankliniella fusca*, tripses do tabaco; *Cephus cinctus*, vespão de caule de trigo; *Aceria tulipae*, ácaro do chochamento do trigo; Girassol: *Suleima helianthana*, mariposa do botão de girassol; *Homoeosoma electellum*, mariposa do girassol; *Zygogramma exclamationis*, besouro do girassol; *Bothyrus gibbosus*, besouro da cenoura; *Neolasioptera murtfeldtiana*, mosquito-pólvora da semente de girassol; Algodão: *Heliothis virescens*, lagarta do botão do algodão; *Helicoverpa zea*, lagarta da cápsula do algodão; *Spodoptera exigua*, lagarta militar da beterraba; *Pectinophora gossypiella*, lagarta rosada; *Anthonomus grandis*, gorgulho da cápsula; *Aphis gossypii*, pulgão do algodão; *Pseudatomoscelis seriatus*, gafanhoto voador do algodão; *Trialeurodes abutilonea*, mosca branca de asas listradas; *Lygus lineolaris*, besouro de planta manchada; *Melanoplus femurrubrum*, gafanhoto de pernas vermelhas; *Melanoplus diferentesialis*, gafanhoto diferencial; *Thrips tabaci*, tripses da cebola; *Frankliniella fusca*, tripses do tabaco; *Tetranychus cinnabarinus*, ácaro rajado carmim; *Te-*
- 20
25
30

tranychus urticae, ácaro rajado; Arroz: *Diatraea saccharalis*, broca da cana de açúcar; *Spodoptera frugiperda*, lagarta militar cortadora; *Helicoverpa zea*, lagarta da espiga de milho; *Colaspis brunnea*, colaspis de uva; *Lissorhoptrus oryzophilus*, gorgulho aquático do arroz; *Sitophilus oryzae*, gorgulho do arroz; *Nephotettix nigropictus*, gafanhoto do arroz; *Blissus leucopterus leucopterus*, percevejo de trigais; *Acrosternum hilare*, percevejo verde; Soja: *Pseudoplusia includens*, lagarta mede palmo da soja; *Anticarsia gemmatilis*, lagarta da soja; *Plathypena scabra*, larva de trevo verde; *Ostrinia nubilalis*, broca do milho europeu; *Agrotis ipsilon*, lagarta-rosca negra; *Spodoptera exigua*, lagarta militar da beterraba; *Heliothis virescens*, lagarta do botão do algodão; *Helicoverpa zea*, lagarta da cápsula do algodão; *Epilachna varivestis*, lagarta do feijão mexicano; *Myzus persicae*, pulgão de pêssego verde; *Empoasca fabae*, gafanhoto da batata; *Acrosternum hilare*, percevejo verde; *Melanoplus femurrubrum*, gafanhoto de pernas vermelhas; *Melanoplus differentialis*, gafanhoto diferencial; *Hylemya platura*, larva da mosca de grão de milho; *Sericotripes variabilis*, tripes da soja; *Thrips tabaci*, tripes da cebola; *Tetranychus turkestanii*, Tetranychidae do morango; *Tetranychus urticae*, ácaro rajado; Cevada: *Ostrinia nubilalis*, broca do milho europeu; *Agrotis ipsilon*, lagarta-rosca negra; *Schizaphis graminum*, pulgão verde; *Blissus leucopterus leucopterus*, percevejo de trigais; *Acrosternum hilare*, percevejo verde; *Euschistus servus*, percevejo marrom; *Delia platura*, larva da mosca de grão de milho; *Mayetiola destructor*, mosca de Hesse; *Petrobia latens*, traça marrom do trigo; Semente Oleosa de Colza: *Brevicoryne brassicae*, pulgão de repolho; *Phyllotreta cruciferae*, besouro saltador; *Mamestra configurata*, lagarta militar Bertha; *Plutella xylostella*, traça das crucíferas; *Delia* ssp., larvas de mosca de raiz.

Métodos para aumentar o rendimento da planta

São fornecidos métodos para aumentar o rendimento da planta. Os métodos compreendem a introdução em uma planta ou célula vegetal de um polinucleotídeo que compreende uma sequência pesticida divulgada aqui. Como definido aqui, o "rendimento" da planta refere-se à qualidade e/ou à quantidade de biomassa produzida pela planta. Por "biomassa" pretende-

se qualquer produto vegetal medido. Um aumento na produção de biomassa é qualquer aprimoramento do rendimento do produto vegetal medido. O aumento do rendimento da planta possui várias aplicações comerciais. Por exemplo, o aumento da biomassa foliar da planta pode aumentar o rendimento de vegetais folhosos para consumo humano ou animal. Adicionalmente, o aumento da biomassa foliar pode ser utilizado para aumentar a produção de produtos farmacêuticos ou industriais derivados de plantas. Um aumento no rendimento pode compreender qualquer aumento estatisticamente significativo que inclui, mas não está limitado a, pelo menos um aumento de 1%, pelo menos um aumento de 3%, pelo menos um aumento de 5%, pelo menos um aumento de 10%, pelo menos um aumento de 20%, pelo menos um aumento de 30%, pelo menos um aumento de 50%, pelo menos um aumento de 70%, pelo menos um aumento de 100% ou maior do rendimento comparado com aquele de uma planta que não expressa a sequência pesticida.

Em métodos específicos, o rendimento da planta é maior como um resultado de maior resistência a pragas de uma planta que expressa uma proteína pesticida divulgada aqui. A expressão da proteína pesticida resulta em uma capacidade reduzida de uma praga de infestar ou de se alimentar da planta, aumentando assim o rendimento da planta.

Os exemplos a seguir são oferecidos com a finalidade de ilustração e não com a finalidade de limitação.

EXPERIMENTAL

Exemplo 1. Descoberta de novos genes pesticidas de *Bacillus thuringiensis*

Os novos genes pesticidas foram identificados partindo de cepas de bactérias listadas na Tabela 1 utilizando as etapas a seguir:

- Preparação de DNA extracromossômico proveniente da cepa, que inclui plasmídeos que carregam tipicamente genes da delta-endotoxina
- Cisalhamento mecânico do DNA extracromossômico para gerar fragmentos distribuídos em relação ao tamanho
- Clonagem de fragmentos de ~2 Kb até ~10 Kb do DNA extracromossômico
- Crescimento de ~1500 clones do DNA extracromossômico

- Sequenciamento parcial dos 1500 clones utilizando iniciadores específicos para o vetor de clonagem (leituras finais)
- Identificação dos supostos genes de toxina através da análise da homologia pela abordagem de MiDAS (como descrito na Publicação de Patente U.S. No. 20040014091, que é incorporada aqui como referência em sua totalidade)
- Acabamento das sequências ("walking") dos clones que contêm fragmentos dos supostos genes de toxina de interesse

Tabela 1. Lista de novos genes isolados de *Bacillus thuringiensis*

Gene	Cepa	SEQ ID NO de Nucleotídeos:	SEQ ID NO de Aminoácidos:	Porcentagem de identidade com a sequência mais próxima na técnica	Sequência mais próxima na técnica
<i>axmi046</i> ¹	ATX13026	1	61	54,30%	Cry4Aa1
<i>axmi048</i> ²	ATX13026	2	62	56,4	Cry4Ba1
<i>axmi050</i> ³	ATX21049	3	63	17,9%	Cry21Ba1
<i>axmi051</i> ⁴	ATX21049	4	64	21,3%	Cry35Ac1
<i>axmi052</i> ⁵	ATX21049	5	65	19,70%	Cry35Aa1
<i>axmi053</i>	ATX21049	6	66	21,9%	Cry35Ac1
<i>axmi054</i>	ATX21049	7	67	20,1%	Cry35Ac1
<i>axmi055</i>	ATX12976	8	68	42,0%	Cry32Ca1
<i>axmi056</i>	ATX12976	9	69	(homologia com o terminal N)	BinA/BinB
<i>axmi057</i>	ATX13058	10	70	73,1%	Cry32Da1
<i>axmi058</i>	ATX13058	11	71	26,8%	Cry6Ba1
<i>axmi059</i>	ATX13058	12	72	56,0%	Cry32Aa1
<i>axmi060</i>	ATX13058	13	73	54,6%	Cry32Aa1
<i>axmi061</i>	ATX13058	14	74	29,2%	Cry45Aa1
<i>axmi067</i>	ATX12974	15	75	36,3%	Cry32Da1

Continuação...

Gene	Cepa	SEQ ID NO de Nucleotídeos:	SEQ ID NO de Aminoácidos:	Porcentagem de identidade com a sequência mais próxima na técnica	Sequência mais próxima na técnica
<i>axmi069</i>	ATX12997	17	77	Cry32Ca1	Alguna homologia com o terminal N
<i>axmi071</i>	ATX12982	18	78	22,9%	Cry21Ba1
<i>axmi072</i>	ATX12982	19	79	16,4%	Mtx2
<i>axmi073</i>	ATX16042	20	80	15,3%	Mtx2
<i>axmi074</i>	ATX12993	21	81	43,8%	Cry21Ba1
<i>axmi075</i>	ATX12997	22	82	30,4%	Cry32Da1
<i>axmi087</i>	ATX13030	27	87	71,0%	Cry8Aa1
<i>axmi088</i>	ATX13039	28	88	26,2%	Cry21Ba1
<i>axmi093</i>	ATX13058	31	91	56,1%	Cry32Aa1

¹Coatividade potencial quando expressa ou pareada com outra toxina tal como Axmi0014 ou Axmi008

²Coatividade potencial quando expressa ou pareada com outra toxina tal como Axmi0014 ou Axmi009

³Um domínio N-terminal homólogo a um domínio catalítico da fosfolipase C

⁴Coatividade potencial quando expressa ou pareada com outra toxina tal como Axmi052

⁵Coatividade potencial quando expressa ou pareada com outra toxina tal como Axmi051

Exemplo 2. Descoberta de novos genes pesticidas de *Bacillus thuringiensis*

Novos genes pesticidas foram identificados provenientes das cepas listadas na Tabela 2 utilizando a abordagem de MiDAS como descrito na Publicação de Patente U.S. No. 20040014091, que é incorporada aqui por referência em sua totalidade, utilizando as etapas a seguir:

- Preparação de DNA extracromossômico proveniente da cepa. O DNA extracromossômico contém uma mistura de alguns ou todos os seguintes: plasmídeos de vários tamanhos; cromossomos de fagos; fragmentos de DNA genômico não separados através do protocolo de purificação; outras moléculas extracromossômicas não caracterizadas.
- Cisalhamento mecânico ou enzimático do DNA extracromossômico para gerar fragmentos distribuídos em relação ao tamanho.
- Sequenciamento do DNA fragmentado
- Identificação de supostos genes de toxina através da homologia e/ou de outras análises de computador.
- Quando necessário, o acabamento das sequências do gene de interesse através de uma de várias estratégias de PCR ou de clonagem (por exemplo, TAIL-PCR).

Tabela 2. Lista de novos genes isolados de *Bacillus thuringiensis*

Gene	Cepa	SEQ ID NO de Nucleotídeos:	SEQ ID NO de Aminoácidos:	Porcentagem de identidade com a sequência mais próxima na técnica	Sequência mais próxima na técnica
axmi079	ATX12974	23	83	36,7%	Cry32Da1
axmi080	ATX12974	24	84	39,9%	Cry42Aa1
axmi081	ATX12974	25	85	68%	Orf3, descrito como "metade C-terminal de uma Proteína Cry"
axmi082	ATX13056	26	86	47,8%	Cry32Da1
axmi091	ATX13053	29	89	35,3%	Cry8Ba1
axmi092	ATX13053	30	90	74,4%	Cry39Orf2
axmi096	ATX13007	32	92	29,6%	Cry32Da1
axmi097	ATX13007	33	93	29,3%	Cry32Da1
axmi098	ATX13007	34	94	56%	Cry41Ab1
axmi099	ATX13007	35	95	69%	axmi081
				61%	axmi067
				60%	axmi079
				45%	axmi075
				45%	Cry32Ca1

Continuação...

Gene	Cepa	SEQ ID NO de Nucleotídeos:	SEQ ID NO de Aminoácidos:	Porcentagem de identidade com a sequência mais próxima na técnica	Sequência mais próxima na técnica
<i>axmi100</i>	ATX12990	36	96	77% 76% 74% 72%	Cry9Ca1 Cry9Ea1 axmi002 Cry9Bb1
<i>axmi101</i>	ATX13035	37	97	65% 62% 60% 58%	Cry7Ba1 axmi037 axmi029 Cry7Ab2
<i>axmi102</i>	ATX13056	38	98	86% 65% 58% 56%	axmi082 axmi093 axmi059 Cry32Aa1
<i>axmi103</i>	ATX13056	39	99	64% 58% 56% 52%	axmi082 Cry32Da1 axmi093 axmi059

Continuação...

Gene	Cepa	SEQ ID NO de Nucleotídeos:	SEQ ID NO de Aminoácidos:	Porcentagem de identidade com a sequência mais próxima na técnica	Sequência mais próxima na técnica
axmi104	ATX13058	40	100	19,3%	axmi020
				18,3%	Cry21Ba1
				17,1%	Cry5Ba1
				17,1%	Cry44Aa
axmi107	ATX13007	41	101	35%	Vip1Aa2
				34%	Vip1Da1
axmi108	ATX12984	42	102	90%	Cry45Aa1
				25%	Cry23Aa1
axmi109	ATX12984	43	103	38%	Cry45Aa1
axmi110	ATX12984	44	104	43%	Cry32Aa1
axmi111	ATX12984	45	105	34%	Cry41Ab1
axmi112	ATX12987	46	106	96%	Cry1Ab
axmi114	ATX14903	47	107	85,8%	axmi043
				85,8%	axmi028
				56,7%	axmi037
				57,2%	Cry7Ca1
				56,3%	Cry7Ab2

Continuação...

Gene	Cepa	SEQ ID NO de Nucleotídeos:	SEQ ID NO de Aminoácidos:	Porcentagem de identidade com a sequência mais próxima na técnica	Sequência mais próxima na técnica
axmi116	ATX12975	48	108	53,5%	Cry7Ba1
				53,2%	axmi114
				53,1%	axmi028
				53%	axmi043
				52,3%	Cry7Ca1
axmi117	ATX13029	49	109 110	50,3%	Cry7Ab1
				92,2%	Cry22Ba1
				48,2%	Cry22Aa1
axmi118	ATX12989	50	111	47,1%	Cry22Ab1
				25,3%	axmi011
axmi119	ATX13029	51	112	22,2%	Mtx2
				28,8%	axmi027
				27,8%	axmi066
				27,5%	Cry2Ae1
				26,5%	axmi076
				26,2%	Cry18Aa1

Continuação...

Gene	Cepa	SEQ ID NO de Nucleotídeos:	SEQ ID NO de Aminoácidos:	Porcentagem de identidade com a sequência mais próxima na técnica	Sequência mais próxima na técnica
axmi120	ATX13034	52 53 54	113 114 115	50%	Cry8Aa1
				49,5%	axmi087
				49,1%	Cry8Bb1
				47,8%	Cry8Bc1
				47,8%	Cry8Da1
axmi121	ATX13034	55	116	47%	Cry8Ba1
				45,8%	Cry8Ca1
				51,1%	axmi013
axmi122	ATX13034	56	117	47,9%	Mtx3
				23,1%	axmi013
				22,8%	Mtx2
				22,1%	Mtx3
axmi123	ATX12989	57	118	21,4%	axmi095
				26,7%	Cry33Aa1
				22,7%	Cry23Aa1
				21,8%	Cry15Aa1
				19%	axmi061

Continuação...

Gene	Cepa	SEQ ID NO de Nucleotídeos:	SEQ ID NO de Aminoácidos:	Porcentagem de identidade com a sequência mais próxima na técnica	Sequência mais próxima na técnica
<i>axmi124</i>	ATX9387	58	119	57,6%	axmi088
				29,1%	axmi040
				28,4%	axmi049
				27,1%	Cry5Ab1
				26,5%	Cry21Ba1
				26,1%	Cry12Aa1
				25,6%	axmi074
				24,4%	axmi031
<i>axmi125</i> ⁷	ATX13029	59	120	38,4%	Cry10Aa1
				36,7%	Cry10Aa2
				31,3%	axmi007
				31%	axmi006
<i>axmi126</i> ⁸	ATX13029	60	121	82,6%	axmi047
				81,5%	axmi084
				80,9%	axmi086
				80,9%	axmi090
				80,5%	axmi046
				79,2%	axmi048
				75,3%	axmi092
				65%	Cry4Ba1
				64,1%	Cry4Aa1

Continuação...

Gene	Cepa	SEQ ID NO de Nucleotídeos:	SEQ ID NO de Aminoácidos:	Porcentagem de identidade com a sequência mais próxima na técnica	Sequência mais próxima na técnica
<i>axmi127</i>	ATX13034	124	133	58%	Cry8Da1
<i>axmi129</i>	ATX13015	125	134	63%	Cry8Aa1
<i>axmi164</i>	ATX22201	126	135	77%	Cry8Aa1
<i>axmi151</i>	ATX12998	127	136	61%	Cry7Ba
<i>axmi161</i>	ATX12998	128	137	52%	Cry7Ca1
<i>axmi183</i>	ATX14775	129	138	69%	Cry9Eb1
<i>axmi132</i>	ATX13029	130	139	55%	Cry4Ba
<i>axmi138</i>	ATX13027	131	140	47%	Cry41Aa1
<i>axmi137</i>	ATX9387	132	141	61%	Axmi075

¹Este gene é a porção N-terminal de um gene cry dividido e é pareado em seu contexto nativo com Axmi126, que representa a porção C-terminal do par de cry dividido. Estes genes podem atuar como cotoxinas e podem exibir atividade maior, nova ou alterada quando coexpressos ou fundidos. A região intermediária entre Axmi125 e o Axmi126 a jusante é apresentada na SEQ ID NO: 122.

²Este gene é a porção C-terminal de um gene cry dividido e é pareado em seu contexto nativo com Axmi125, que representa a porção N-terminal do par de cry dividido. Estes genes podem atuar como cotoxinas e podem exibir atividade maior, nova ou alterada quando coexpressos ou fundidos.

Exemplo 3. Descoberta de um novo gene de toxina Axmi068 da cepa ATX13046 de *Bacillus thuringiensis*.

A cepa que codifica *axmi068* foi identificada como a seguir:

5 • A informação de sequência proveniente de genes de toxina conhecidos ou suspeitos foi utilizada para gerar um alinhamento que representa sequências de DNA conservadas e parcialmente conservadas dentro de um grupo (família) de toxinas.

10 • Os iniciadores da reação em cadeia da polimerase (PCR) foram planejados para amplificar seletivamente um ou mais membros da família de toxina com base na sequência alinhada.

 • O DNA isolado de cepas bacterianas foi verificado através da PCR para a identificação de cepas que contêm os supostos homólogos da família do gene-alvo.

15 • Os produtos da PCR foram sequenciados para selecionar uma cepa que contém um gene de interesse.

A sequência gênica completa foi identificada partindo da cepa selecionada através da abordagem genômica de MiDAS (Publicação de Patente U.S. No. 20040014091) como a seguir:

20 • Preparação de DNA extracromossômico proveniente da cepa. O DNA extracromossômico contém uma mistura de alguns ou todos os seguintes: plasmídeos de vários tamanhos; cromossomos de fagos; fragmentos de DNA genômico não separados através do protocolo de purificação; outras moléculas extracromossômicas não caracterizadas.

25 • Cisalhamento mecânico ou enzimático do DNA extracromossômico para gerar fragmentos distribuídos em relação ao tamanho.

 • Clonagem dos fragmentos de DNA extracromossômico em um vetor plasmideal.

 • Crescimento e purificação do clone do DNA extracromossômico.

30 • Sequenciamento parcial dos clones.

 • Identificação de supostos genes de toxina através da homologia e/ou de outras análises de computador.

- Quando necessário, o acabamento das sequências ("walking") dos clones que contêm sequência dos supostos genes de toxina de interesse.

- A sequência de nucleotídeos para *axmi068* é apresentada na SEQ ID NO: 16 e a sequência de aminoácidos para AXMI068 é apresentada na SEQ ID NO: 76.

Características dos Genes e das Proteínas

Comprimento do gene, pares de bases de DNA:1.791

Comprimento da proteína, resíduos de aminoácidos:597

- 10 Peso molecular estimado da proteína. Da:66.495

Homólogos conhecidos e porcentagem de identidade aproximada:Cry1Id1, 71,4%

Exemplo 4. Expressão em *Bacillus*

- O gene inseticida divulgado aqui é amplificado através da PCR e
- 15 o produto da PCR é clonado no vetor de expressão pAX916 de *Bacillus* ou outro vetor adequado, através de métodos bem conhecidos na técnica. A cepa de *Bacillus* resultante, contendo o vetor com o gene *axmi* é cultivada em um meio de crescimento convencional, tal como meio CYS (10 g/L de Bacto-casitona; 3 g/L de extrato de levedura; 6 g/L de KH₂PO₄; 14 g/L de
- 20 K₂HPO₄; 0,5 mM de MgSO₄; 0,05 mM de MnCl₂; 0,05 mM de FeSO₄), até a esporulação ser evidente por verificação microscópica. As amostras são preparadas e testadas em relação à atividade em ensaios biológicos.

Exemplo 5. Construção de sequências sintéticas

- Em um aspecto da invenção, foram geradas sequências sintéticas de *axmi*. Estas sequências sintéticas têm uma sequência de DNA alterada em relação à sequência de *axmi* original e codificam uma proteína que é colinear à proteína AXMI original à qual corresponde, mas falta o "domínio de cristal" C-terminal presente em muitas proteínas de delta-endotoxina. Os genes sintéticos são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3.

Nome do Gene do Tipo Selvagem	Nome do Gene Sintético	SEQ ID NO:
<i>axmi050</i>	<i>axmi050bv01</i>	142
	<i>axmi050bv02</i>	143
<i>axmi051</i>	<i>axmi051bv01</i>	144
	<i>axmi051bv02</i>	145
<i>axmi052</i>	<i>axmi052bv01</i>	146
	<i>axmi052bv02</i>	147
<i>axmi053</i>	<i>axmi053bv01</i>	148
	<i>axmi053bv02</i>	149
<i>axmi054</i>	<i>axmi054bv01</i>	150
	<i>axmi054bv02</i>	151
<i>axmi055</i>	<i>axmi055bv01</i>	152
	<i>axmi055bv02</i>	153
<i>axmi056</i>	<i>axmi056bv01</i>	154
	<i>axmi056bv02</i>	155
<i>axmi057</i>	<i>axmi057bv01</i>	156
	<i>axmi057bv02</i>	157
<i>axmi058</i>	<i>axmi058bv01</i>	158
	<i>axmi058bv02</i>	159
<i>axmi059</i>	<i>axmi059_1bv01</i>	160
	<i>axmi059_1bv02</i>	161
	<i>axmi059_2bv01</i>	162
	<i>axmi059_2bv02</i>	163
<i>axmi060</i>	<i>axmi060bv01</i>	164
	<i>axmi060bv02</i>	165
<i>axmi061</i>	<i>axmi061bv01</i>	166
	<i>axmi061bv02</i>	167
<i>axmi067</i>	<i>axmi067bv01</i>	168
	<i>axmi067bv02</i>	169

Nome do Gene do Tipo Selvagem	Nome do Gene Sintético	SEQ ID NO:
<i>axmi069</i>	<i>axmi069bv01</i>	170
	<i>axmi069bv02</i>	171
<i>axmi071</i>	<i>axmi071bv01</i>	172
	<i>axmi071bv02</i>	173
<i>axmi072</i>	<i>axmi072bv01</i>	174
	<i>axmi072bv02</i>	175
<i>axmi073</i>	<i>axmi073bv01</i>	176
	<i>axmi073bv02</i>	177
<i>axmi074</i>	<i>axmi074bv01</i>	178
	<i>axmi074bv02</i>	179
<i>axmi075</i>	<i>axmi075bv01</i>	180
	<i>axmi075bv02</i>	181
<i>axmi079</i>	<i>axmi079bv01</i>	182
	<i>axmi079bv02</i>	183
<i>axmi080</i>	<i>axmi080bv01</i>	184
	<i>axmi080bv02</i>	185
<i>axmi082</i>	<i>axmi082bv01</i>	186
	<i>axmi082bv02</i>	187
<i>axmi087</i>	<i>axmi087_1bv01</i>	188
	<i>axmi087_1bv02</i>	189
	<i>axmi087_2bv01</i>	190
	<i>axmi087_2bv02</i>	191
<i>axmi088</i>	<i>axmi088bv01</i>	192
	<i>axmi088bv02</i>	193
<i>axmi091</i>	<i>axmi091bv01</i>	194
	<i>axmi091bv02</i>	195
<i>axmi093</i>	<i>axmi093bv01</i>	196
	<i>axmi093bv02</i>	197
<i>axmi096</i>	<i>axmi096bv01</i>	198

Nome do Gene do Tipo Selvagem	Nome do Gene Sintético	SEQ ID NO:
	<i>axmi096bv02</i>	199
<i>axmi097</i>	<i>axmi097_1bv01</i>	200
	<i>axmi097_1bv02</i>	201
	<i>axmi097_2bv01</i>	202
	<i>axmi097_2bv02</i>	203
<i>axmi098</i>	<i>axmi098bv01</i>	204
	<i>axmi098bv02</i>	205
<i>axmi100</i>	<i>axmi100bv01</i>	206
	<i>axmi100bv02</i>	207
	<i>optaxmi100v01</i>	282
	<i>optaxmi100v02</i>	283
<i>axmi101</i>	<i>axmi101_1bv01</i>	208
	<i>axmi101_1bv02</i>	209
	<i>axmi101_2bv01</i>	210
	<i>axmi101_2bv02</i>	211
<i>axmi102</i>	<i>axmi102bv01</i>	212
	<i>axmi102bv02</i>	213
<i>axmi103</i>	<i>axmi103bv01</i>	214
	<i>axmi103bv02</i>	215
<i>axmi104</i>	<i>axmi104bv01</i>	216
	<i>axmi104bv02</i>	217
<i>axmi107</i>	<i>axmi107bv01</i>	218
	<i>axmi107bv02</i>	219
<i>axmi108</i>	<i>axmi108bv01</i>	220
	<i>axmi108bv02</i>	221
<i>axmi109</i>	<i>axmi109bv01</i>	222
	<i>axmi109bv02</i>	223
<i>axmi110</i>	<i>axmi110bv01</i>	224
	<i>axmi110bv02</i>	225

Nome do Gene do Tipo Selvagem	Nome do Gene Sintético	SEQ ID NO:
<i>axmi111</i>	<i>axmi111bv01</i>	226
	<i>axmi111bv02</i>	227
<i>axmi112</i>	<i>axmi112bv01</i>	228
	<i>axmi112bv02</i>	229
<i>axmi114</i>	<i>axmi114bv01</i>	230
	<i>axmi114bv02</i>	231
<i>axmi116</i>	<i>axmi116bv01</i>	232
	<i>axmi116bv02</i>	233
<i>axmi117</i>	<i>axmi117bv01</i>	234
	<i>axmi117bv02</i>	235
<i>axmi118</i>	<i>axmi118bv01</i>	236
	<i>axmi118bv02</i>	237
<i>axmi119</i>	<i>axmi119bv01</i>	238
	<i>axmi119bv02</i>	239
<i>axmi120</i>	<i>axmi120_1bv01</i>	240
	<i>axmi120_1bv02</i>	241
	<i>axmi120_2bv01</i>	242
	<i>axmi120_2bv02</i>	243
<i>axmi121</i>	<i>axmi121bv01</i>	244
	<i>axmi121bv02</i>	245
<i>axmi122</i>	<i>axmi122bv01</i>	246
	<i>axmi122bv02</i>	247
<i>axmi123</i>	<i>axmi123bv01</i>	248
	<i>axmi123bv02</i>	249
<i>axmi124</i>	<i>axmi124bv01</i>	250
	<i>axmi124bv02</i>	251
<i>axmi125</i>	<i>axmi125bv01</i>	252
	<i>axmi125bv02</i>	253
<i>axmi127</i>	<i>axmi127_1bv01</i>	254

Nome do Gene do Tipo Selvagem	Nome do Gene Sintético	SEQ ID NO:
	<i>axmi127_1bv02</i>	255
	<i>axmi127_2bv01</i>	256
	<i>axmi127_2bv02</i>	257
<i>axmi129</i>	<i>axmi129_1bv01</i>	258
	<i>axmi129_1bv02</i>	259
	<i>axmi129_2bv01</i>	260
	<i>axmi129_2bv02</i>	261
<i>axmi137</i>	<i>axmi137bv01</i>	262
	<i>axmi137bv02</i>	263
<i>axmi138</i>	<i>axmi138bv01</i>	264
	<i>axmi138bv02</i>	265
<i>axmi151</i>	<i>axmi151_1bv01</i>	266
	<i>axmi151_1bv02</i>	267
	<i>axmi151_2bv01</i>	268
	<i>axmi151_2bv02</i>	269
<i>axmi161</i>	<i>axmi161_1bv01</i>	270
	<i>axmi161_1bv02</i>	271
	<i>axmi161_2bv01</i>	272
	<i>axmi161_2bv02</i>	273
<i>axmi164</i>	<i>axmi164_1bv01</i>	274
	<i>axmi164_1bv02</i>	275
	<i>axmi164_2bv01</i>	276
	<i>axmi164_2bv02</i>	277
<i>axmi183</i>	<i>axmi183_2bv01</i>	278
	<i>axmi183_2bv02</i>	279
	<i>axmi183bv01</i>	280
	<i>axmi183bv02</i>	281

Em outro aspecto da invenção, versões modificadas de genes sintéticos são planejadas de forma que o peptídeo resultante seja direciona-

do para uma organela da planta, tal como o retículo endoplasmático ou o apoplasto. As sequências peptídicas conhecidas por resultarem no direcionamento de proteínas de fusão para organelas da planta são conhecidas na técnica. Por exemplo, a região N-terminal do gene da fosfatase ácida do tremoceiro comum *Lupinus albus* (Genebank ID GI: 14276838; Miller e outros (2001) *Plant Physiology* 127: 594-606) é conhecida na técnica por resultar no direcionamento para o retículo endoplasmático de proteínas heterólogas. Se a proteína de fusão resultante também contiver uma sequência de retenção endoplasmática que compreende o peptídeo N-terminal-lisina-ácido aspártico-ácido glutâmico-leucina (isto é, o motivo "KDEL" (SEQ ID NO: 123) no terminal C, a proteína de fusão será direcionada para o retículo endoplasmático. Se a proteína de fusão não tiver uma sequência de direcionamento para o retículo endoplasmático no terminal C, a proteína será direcionada para o retículo endoplasmático, mas será em última análise sequestrada no apoplasto.

Exemplo 6. Expressão de *axmi100* em *E. coli* e *Bacillus*

O ORF completo de *axmi100* (3,45 kb que codificam uma proteína de 1156 aminoácidos de comprimento) foi clonado em um vetor de expressão de *E. coli* baseado no pRSF1b (para fornecer pAX5445) e um vetor de *Bacillus* baseado no pAX916 (para fornecer pAX5444). Os clones resultantes foram confirmados através da análise de restrição e finalmente, através do sequenciamento completo do gene clonado.

Para a expressão em *E. coli*, BL21*DE3 foi transformada com pAX5445. Uma colônia isolada foi inoculada em LB suplementado com canamicina e crescida durante a noite a 37°C. No dia seguinte, o meio fresco foi inoculado em duplicata com 1% da cultura crescida durante a noite e crescido a 37°C até a fase logarítmica. Subsequentemente, as culturas foram induzidas com 1 mM de IPTG durante 3 horas a 37°C ou durante a noite a 20°C. Cada pelota de células foi suspensa em 50 mM de tampão carbonato de sódio, pH 10,5 suplementado com 1 mM de DTT e submetida a ultrassom. A análise por SDS-PAGE detectou a expressão de uma proteína de 130 kD correspondendo a *Axmi100*.

Para a expressão em *Bacillus*, *Bacillus thuringiensis* foi transformado com pAX5444 e uma colônia isolada foi crescida em meio CYS-glu durante 3 dias até a esporulação. A pelota de células foi então extraída com 50 mM de tampão carbonato de sódio, pH 10,5 suplementado com 1 mM de DTT. A fração solúvel mostrou a presença de uma proteína Axmi100 de 130 kD junto com várias bandas de proteínas de pesos moleculares menores devido ao processamento de Axmi100. A tripsinização de Axmi100 forneceu 2 bandas de proteínas distintas de aproximadamente 65 kD e 55 kD.

Exemplo 7. Ensaio Biológico de Axmi100

10 *Preparação de Amostras:*

Os extratos isentos de células de células expressando AXMI-100 foram tipicamente ressuspensos em 50 mM de tampão carbonato de sódio, pH 10,5, tipicamente com a inclusão de 1 mM de DTT como um agente redutor. As amostras com e sem tripsina foram preparadas para o teste de ensaio biológico.

Sumário da Metodologia do Bioensaio:

Placas de cultura de tecido de 24 poços (Corning) receberam 1 mL de dieta para várias espécies (Bio-Serv) e foi permitido que solidificassem. Uma vez solidificadas, 40 µL de amostra de proteína foram colocados na superfície da dieta de cada poço e foi permitido que embebessem/secassem à temperatura ambiente. Dependendo do experimento, massas de ovo ECB, dez larvas neonatas ou uma única larva neonata foi colocada em cada poço. As placas foram seladas com membranas permeáveis a gases (Research Products International) e incubadas a 25 °C e 90% de UR. Após cinco ou sete dias (dependendo do experimento), as amostras foram classificadas visualmente comparadas com um controle de apenas tampão ou de extrato não transformado.

A forte atividade de AXMI-100 foi observada sobre a Broca do Milho Europeu e da Larva de Botão do Tabaco. A atividade sobre a lagartarosca negra foi observada em altas concentrações de proteína. Alguma atividade também foi observada em altas concentrações sobre a lagarta da soja, mas a atividade tanto sobre a lagarta-rosca negra quanto a lagarta da

soja era menos pronunciada e mais variável que para os outros insetos testados. A tripsinização de Axmi100 forneceu 2 bandas de proteínas distintas de aproximadamente 65 kD e 55 kD e não parecia ser necessária para a atividade de AXMI-100.

5 Exemplo 8. Ensaios Adicionais da Atividade Pesticida

A capacidade de uma proteína pesticida de atuar como um pesticida sobre uma praga é frequentemente avaliada de várias maneiras. Uma maneira bem conhecida na técnica é a realização de um ensaio de alimentação. Em tal ensaio de alimentação, a praga é exposta a uma amostra que contém os compostos que serão testados ou amostras de controle. Frequentemente isto é realizado colocando o material que será testado ou uma diluição adequada de tal material, sobre um material que a praga irá ingerir, tal como uma dieta artificial. O material que será testado pode ser composto de um líquido, um sólido ou uma suspensão. O material que será testado pode ser colocado sobre a superfície e então é permitido que seque. Alternativamente, o material que será testado pode ser misturado com uma dieta artificial fundida, então distribuído dentro da câmara de ensaio. A câmara de ensaio pode ser, por exemplo, um copo, um prato ou um poço de uma placa de microtitulação.

Os ensaios para pragas sugadoras (por exemplo, pulgões) podem envolver a separação do material de teste do inseto através de uma divisão, de forma ideal uma porção que pode ser perfurada pelas partes bucais sugadoras do inseto sugador, para permitir a ingestão do material de teste. Frequentemente o material de teste é misturado com um estimulante de alimentação, tal como a sacarose, para promover a ingestão do composto de teste.

Outros tipos de ensaios podem incluir a microinjeção do material de teste dentro da boca ou do intestino da praga, bem como o desenvolvimento de plantas transgênicas, seguido pelo teste da capacidade da praga de se alimentar da planta transgênica. O teste com planta pode envolver o isolamento de partes da planta normalmente consumidas, por exemplo, pequenas gaiolas ligadas a uma folha ou o isolamento de plantas inteiras em

gaiolas contendo insetos.

Outros métodos e abordagens para analisar as pragas são conhecidos na técnica e podem ser encontrados, por exemplo, em Robertson, J. L. & H. K. Preisler. 1992. *Pesticide bioassays with arthropods*. CRC, Boca Raton, FL. Alternativamente, os ensaios estão comumente descritos nos periódicos "Arthropod Management Tests" e "Journal of Economic Entomology" ou por discussão com membros da Sociedade Entomológica da América (Entomological Society of America (ESA)).

Exemplo 9. Bioensaio de Axmi079 e Axmi082

10 *Expressão e Purificação Gênica*

• As regiões de DNA que codificam os domínios de toxina de Axmi079 e Axmi082 foram clonadas separadamente em um vetor de expressão de *E. coli* pMAL-C4x atrás do gene *malE* que codifica a proteína de ligação com a Maltose (MBP). Estas fusões em quadro resultaram na expressão de proteínas de fusão MBP-Axmi em *E. coli*.

• Para a expressão em *E. coli*, BL21*DE3 foi transformada com plasmídeos individuais. Uma colônia isolada foi inoculada em LB suplementado com carbenicilina e glicose e crescida durante a noite a 37°C. No dia seguinte, o meio fresco foi inoculado com 1% da cultura realizada durante a noite e crescido a 37°C até a fase logarítmica. Subsequentemente, as culturas foram induzidas com 0,3 mM de IPTG durante a noite a 20°C. Cada pelota de célula foi suspensa em 20 mM de tampão Tris-Cl, pH 7,4 + 200 mM de NaCl + 1 mM de DTT + inibidores de proteases e submetida a ultrassom. A análise por SDS-PAGE confirmou a expressão de proteínas de fusão.

• Extratos isentos de células totais foram corridos ao longo de uma coluna de amilose conectada ao FPLC para a purificação por afinidade das proteínas de fusão MBP-axmi. A proteína de fusão ligada foi eluída da resina com uma solução de maltose a 10 mM. As proteínas de fusão purificadas foram então clivadas com Fator Xa ou tripsina para remover a marcação MBP amino terminal da proteína Axmi. A clivagem e a solubilidade das proteínas foram determinadas por SDS-PAGE.

Bioensaios com Insetos

• As proteínas clivadas foram testadas em ensaios com insetos com controles apropriados. Uma leitura das placas no dia 5 mostrou as atividades a seguir destas proteínas.

Proteína Axmi	Proteína de fusão MBP-Axmi clivada com	Atividade sobre os insetos
Axmi079	Fator Xa, tripsina	Traça do gênero <i>Scythropia</i>
Axmi082	Fator Xa, tripsina	Traça do gênero <i>Scythropia</i>

Resultados de bioensaios com insetos adicionais:

Gene	amostra testada	C. elegans	VBC*	DBM*	SWCB*	CPB*	ECB*	H _z *	H _v *
Axmi50	extrato bruto	3, 3							
Axmi52	purificada, digerida		1, 0%						
Axmi58	purificada, digerida			4, 100%					
Axmi68	extrato bruto	3, 2							
Axmi88	purificada, digerida			1, 0%	1, 0%				
Axmi93	purificada, digerida	20%							
Axmi97	purificada, digerida					1, 0%			
Axmi102	extrato bruto			4, 100%			3, 75%		
Axmi112	purificada, digerida		3, 0%	4, 100%	3, 25%		3, 75%	1, 0%	3, 0%
Axmi117	purificada, digerida			1, 25%					
Axmi100	purificada, digerida			4, 100%			4, 100%		

CPB = Besouro da batata do Colorado

ECB = Broca do milho europeu

Hz = *Helicoverpa zea*

Hv = *Heliothis virescens*

- 5 * = representado como retardo do desenvolvimento e porcentagem de mortalidade quando o retardo do desenvolvimento é classificado de acordo com a escala a seguir:

Escore	Definição
0	Sem Atividade
1	Retardo do desenvolvimento não uniforme ligeiro
2	Retardo do desenvolvimento não uniforme
3	Retardo do desenvolvimento uniforme
4	Retardo do desenvolvimento uniforme com mortalidade (expressa na forma de uma porcentagem)
5	Retardo do desenvolvimento uniforme com 100% de mortalidade

Exemplo 10. Vetorização dos Genes Pesticidas da Invenção para Expressão em Plantas

- 10 Cada uma das regiões codificadoras dos genes da invenção é conectada independentemente a sequências promotoras e terminadoras apropriadas para a expressão em plantas. Tais sequências são bem conhecidas na técnica e podem incluir o promotor da actina do arroz ou o promotor da ubiquitina do milho para a expressão em monocotiledôneas, o promotor
- 15 UBQ3 de *Arabidopsis* ou o promotor 35S de CaMV para a expressão em dicotiledôneas e os terminadores nos ou PinII. As técnicas para a produção e para a confirmação de construtos promotores – genes – terminadores também são bem conhecidas na técnica.

- 20 Exemplo 11. Transformação dos genes da invenção nas células vegetais através de transformação mediada por *Agrobacterium*

As espigas são coletadas 8-12 dias após a polinização. Os embriões são isolados das espigas e tais embriões com tamanho de 0,8-1,5 mm são utilizados para a transformação. Os embriões são plaqueados com o escutelo voltado para cima em um meio de incubação adequado e são in-

cubados durante a noite a 25°C na escuridão. Entretanto, não é necessário *per se* incubar os embriões durante a noite. Os embriões são colocados em contato com uma cepa de *Agrobacterium* contendo os vetores apropriados para a transferência mediada pelo plasmídeo Ti durante 5-10 min e então

5 plaqueados em meio de cocultivo durante 3 dias (25°C na escuridão). Após o cocultivo, os explantes são transferidos para o meio de período de recuperação durante cinco dias (a 25°C na escuridão). Os explantes são incubados em meio de seleção durante até oito semanas, dependendo da natureza e das características da seleção particular utilizada. Após o período de sele-

10 ção, o calo resultante é transferido para o meio de maturação do embrião, até que a formação de embriões somáticos maduros seja observada. Os embriões somáticos maduros resultantes são então colocados sob luz fraca e o método de regeneração é iniciado como conhecido na técnica. É permitido que os brotos resultantes produzam raiz no meio de enraizamento e as

15 plantas resultantes sejam transferidas para vasos de sementeiras e propagadas como plantas transgênicas.

Exemplo 12. Transformação de Células de Milho com os genes pesticidas da invenção

As espigas de milho são coletadas 8-12 dias após a polinização.

20 Os embriões são isolados das espigas e os embriões com tamanho de 0,8-1,5 mm são utilizados para a transformação. Os embriões são plaqueados com o escutelo voltado para cima em um meio de incubação adequado, tal como o meio DN62A5S (3,98 g/L de Sais N6; 1 mL/L (de Estoque 1000x) de Vitaminas N6; 800 mg/L de L-Asparagina; 100 mg/L de Mio-inositol; 1,4 g/L

25 de L-Prolina; 100 mg/L de Casaminoácidos; 50 g/L de sacarose; 1 mL/L (de Estoque a 1 mg/mL) de 2,4-D) e incubados durante a noite a 25°C na escuridão.

Os explantes resultantes são transferidos para quadrados de tela (30-40 por placa), transferidos para o meio osmótico durante 30-45 minutos, então transferidos para uma placa de irradiação (ver, por exemplo, a

30 Publicação PCT No. WO/0138514 e a Patente U.S. Nº 5.240.842).

Os construtos de DNA planejados para expressarem os genes

da invenção nas células vegetais são acelerados para dentro do tecido vegetal utilizando um acelerador de irradiação por aerossol, utilizando condições essencialmente como são descritas na Publicação PCT No. WO/0138514. Após a irradiação, os embriões são incubados durante 30 min em meio osmótico, então colocados em meio de incubação durante a noite a 25°C na escuridão. Para evitar danificar de forma desnecessária os explantes irradiados, estes são incubados durante pelo menos 24 horas antes da transferência para o meio de recuperação. Os embriões são então espalhados sobre o meio de período de recuperação, durante 5 dias, 25°C na escuridão, então transferidos para um meio de seleção. Os explantes são incubados no meio de seleção durante até oito semanas, dependendo da natureza e das características da seleção particular utilizada. Após o período de seleção, o calo resultante é transferido para o meio de maturação de embrião, até que a formação de embriões somáticos maduros seja observada. Os embriões somáticos maduros são então colocados sob luz fraca e o processo de regeneração é iniciado através de métodos conhecidos na técnica. É permitido que os brotos produzam raiz em meio de enraizamento e as plantas resultantes são transferidas para vasos de sementeiras e propagadas como plantas transgênicas.

20 *Materiais*

Meio DN62A5S

Componentes	por litro	Fonte
Mistura de Sal Basal Chu's N6 (Prod. No. C 416)	3,98 g/L	Phytotechnology Labs
Solução de vitamina Chu's N6 (Prod. No. C 149)	1 mL/L (de Estoque de 1000x)	Phytotechnology Labs
L-Asparagina	800 mg/L	Phytotechnology Labs
Mio-inositol	100 mg/L	Sigma
L-Prolina	1,4 g/L	Phytotechnology Labs
Casaminoácidos	100 mg/L	Fisher Scientific
Sacarose	50 g/L	Phytotechnology Labs

Componentes	por litro	Fonte
2,4-D (Prod. No. D-7299)	1 mL/L (de Estoque de 1 mg/mL)	Sigma

5 Ajustar o pH da solução em pH até 5,8 com 1 N de KOH/1 N de KCl, adicionar Gelrite (Sigma) a 3g/L e autoclavar. Após o resfriamento a 50°C, adicionar 2 mL/L de uma solução estoque a 5 mg/mL de Nitrato de Prata (Phytotechnology Labs). O protocolo rende aproximadamente 20 placas.

10 Todas as publicações e os pedidos de patentes mencionados no relatório descritivo são indicativos do nível de conhecimento dos peritos na técnica à qual este invenção pertence. Todas as publicações e os pedidos de patentes são incorporados aqui por referência até a mesma extensão como se cada publicação ou pedido de patente individual fosse especificamente e individualmente indicado como sendo incorporado como referência.

15 Embora a invenção descrita acima tenha sido descrita em alguns detalhes através de ilustração e exemplo com a finalidade de clareza do entendimento, será óbvio que certas alterações e modificações podem ser praticadas dentro do escopo das reivindicações em anexo.

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de ácido nucleico isolada que compreende uma sequência de nucleotídeos selecionada do grupo que consiste em:

5 a) a sequência de nucleotídeos de qualquer uma das SEQ ID NO: 1-60 e 124-132;

b) uma sequência de nucleotídeos que possui pelo menos 90% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeos de qualquer uma das SEQ ID NO: 1-60 e 124-132, em que a dita sequência de nucleotídeos codifica um polipeptídeo que possui atividade pesticida;

10 c) uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NO: 61-121 e 133-141; e,

d) uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 90% de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NO: 61-121 e 133-141, em que o dito polipeptídeo possui atividade pesticida.

2. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com a reivindicação 1, em que a dita sequência de nucleotídeos é uma sequência sintética que foi planejada para expressão em uma planta.

20 3. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com a reivindicação 2, em que a dita sequência de nucleotídeos é selecionada de qualquer uma das SEQ ID NO: 142-283.

4. Vetor que compreende a molécula de ácido nucleico como definida na reivindicação 1.

25 5. Vetor de acordo com a reivindicação 4, que compreende ainda uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo heterólogo.

6. Célula hospedeira que contém o vetor como definido na reivindicação 4.

30 7. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 6, que é uma célula hospedeira bacteriana.

8. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 6, que é uma célula vegetal.

9. Planta transgênica que compreende a célula hospedeira como definida na reivindicação 8.

10. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 9, em que a dita planta é selecionada do grupo que consiste em milho, sorgo, trigo, repolho, girassol, tomate, crucíferas, pimentas, batata, algodão, arroz, soja, beterraba de açúcar, cana de açúcar, tabaco, cevada e semente oleosa de colza.

11. Polipeptídeo isolado com atividade pesticida, selecionado do grupo que consiste em:

10 a) um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NO: 61-121 e 133-141;

b) um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 90% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NO: 61-121 e 133-141, em que o dito polipeptídeo possui atividade pesticida;

c) um polipeptídeo que é codificado pela sequência de nucleotídeos de qualquer uma das SEQ ID NO: 1-60, 124-132 e 142-283; e,

d) um polipeptídeo que é codificado por uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90% idêntica à sequência de nucleotídeos de qualquer uma das SEQ ID NO: 1-60, 124-132 e 142-283, em que o dito polipeptídeo possui atividade pesticida.

12. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 11, que compreende ainda sequências de aminoácidos heterólogas.

13. Anticorpo que se liga seletivamente ao polipeptídeo como definido na reivindicação 11.

14. Composição que compreende o polipeptídeo como definido na reivindicação 11.

15. Composição de acordo com a reivindicação 14, em que a dita composição é selecionada do grupo que consiste em um pó, uma poeira, um pélete, um grânulo, um spray, uma emulsão, um coloide e uma solução.

16. Composição de acordo com a reivindicação 14, em que a dita composição é preparada através de dessecação, liofilização, homogenei-

zação, extração, filtração, centrifugação, sedimentação ou concentração de uma cultura de células de *Bacillus thuringiensis*.

17. Composição de acordo com a reivindicação 14, que compreende de aproximadamente 1% até aproximadamente 99% em peso do dito polipeptídeo.

18. Método para o controle de uma população de pragas de lepidóptero ou coleóptero que compreende o contato da dita população com uma quantidade pesticidamente eficiente do polipeptídeo como definido na reivindicação 11.

19. Método para matar uma praga de lepidóptero ou coleóptero, que compreende o contato da dita praga com ou a alimentação da dita praga, uma quantidade pesticidamente eficiente do polipeptídeo como definido na reivindicação 11.

20. Método para a produção de um polipeptídeo com atividade pesticida, que compreende o cultivo da célula hospedeira como definida na reivindicação 6, sob condições em que a molécula de ácido nucleico que codifica o polipeptídeo é expressa.

21. Planta que possui incorporada de forma estável em seu genoma um construto de DNA que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína que possui atividade pesticida, em que a dita sequência de nucleotídeos é selecionada do grupo que consiste em:

a) a sequência de nucleotídeos de qualquer uma das SEQ ID NO: 1-60, 124-132 e 142-283;

b) uma sequência de nucleotídeos que possui pelo menos 90% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeos de qualquer uma das SEQ ID NO: 1-60, 124-132 e 142-283, em que a dita sequência de nucleotídeos codifica um polipeptídeo que possui atividade pesticida;

c) uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NO: 61-121 e 133-141; e,

d) uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos 90% de identidade de sequência de aminoácidos

com a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NO: 61-121 e 133-141, em que o dito polipeptídeo possui atividade pesticida; em que a dita sequência de nucleotídeos é ligada de forma operacional a um promotor que controla a expressão de uma sequência codificadora em uma
5 célula vegetal.

22. Planta de acordo com a reivindicação 21, em que a dita planta é uma célula vegetal.

23. Semente transgênica da planta como definida na reivindicação 22.

10 24. Método para proteção de uma planta de uma praga, que compreende introdução na dita planta ou na célula da mesma de pelo menos um vetor de expressão que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo pesticida, em que a dita sequência de nucleotídeos é selecionada do grupo que consiste em:

15 a) a sequência de nucleotídeos de qualquer uma das SEQ ID NO: 1-60, 124-132 e 142-283;

b) uma sequência de nucleotídeos que possui pelo menos 90% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeos de qualquer uma das SEQ ID NO: 1-60, 124-132 e 142-283, em que a dita sequência de
20 nucleotídeos codifica um polipeptídeo que possui atividade pesticida;

c) uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NO: 61-121 e 133-141; e,

d) uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo
25 que possui pelo menos 90% de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NO: 61-121 e 133-141, em que o dito polipeptídeo possui atividade pesticida.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, em que a dita planta produz um polipeptídeo pesticida que possui atividade pesticida con-
30 tra uma praga de lepidóptero ou coleóptero.

RESUMO

Patente de Invenção: **"GENES DE TOXINA E MÉTODOS PARA USO DOS MESMOS"**.

A presente invenção refere-se a composições e a métodos para
5 conferir atividade pesticida a bactérias, plantas, células vegetais, tecidos e
sementes. São fornecidas composições que compreendem uma sequência
codificadora de um polipeptídeo de delta-endotoxina. As sequências codifi-
cadoras podem ser utilizadas em construtos de DNA ou cassetes de expres-
são para a transformação e a expressão em plantas e bactérias. As compo-
10 sições compreendem ainda bactérias, plantas, células vegetais, tecidos e
sementes transformados. Em particular, são fornecidas moléculas de ácidos
nucleicos de delta-endotoxina isoladas. Adicionalmente, são abrangidas as
sequências de aminoácidos que correspondem aos polinucleotídeos e os
anticorpos que se ligam especificamente a tais sequências de aminoácidos.
15 Em particular, a presente invenção refere-se a moléculas de ácidos nucleí-
cos isoladas que compreendem sequências de nucleotídeos que codificam a
sequência de aminoácidos mostrada nas SEQ ID NO: 61-121 e 133-141 ou
a sequência de nucleotídeos apresentada nas SEQ ID NO: 1-60, 124-132 e
142-283, bem como variantes e fragmentos das mesmas.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



E83D8A0328C20AD8

Campo 2



0430B628A5503F99

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P171482List.Seq.conf.txt
- Data de Geração do Código: 15-12-2010
- Hora de Geração do Código: 13:33:38
- Código de Controle:
 - Campo 1: E83D8A0328C20AD8
 - Campo 2: 0430B628A5503F99