



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

(11) (21) **PI 0403435-0 A**

(22) Data de Depósito: 08/04/2004
(43) Data de Publicação: **01/08/2006**
(RPI 1856)



(51) Int. Cl⁷ .:
C07K 2/00
C07K 14/32
C07H 21/00
C12N 15/01
A61K 38/46
C12N 9/54

(54) Título: TOXINA PRAGUICIDA, CONSTRUÇÃO GÊNICA, PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PRAGUICIDA, COMPOSIÇÃO PRAGUICIDA, MÉTODO DE CONTROLE DE PRAGAS

(71) Depositante(s): Universidade Federal do Rio Grande do Sul (BR/RS)

(72) Inventor(es): Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini, Claudio Teixeira da Silva Ferreira, Marcelo Gravina de Moraes, Fernanda Mulinari, Melissa Alves Freitas Silva, Maria de Fátima Grossi de Sá, Eleonora Kurtenbach

(57) Resumo: "TOXINA PRAGUICIDA, CONSTRUÇÃO GÊNICA, PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PRAGUICIDA, COMPOSIÇÃO PRAGUICIDA, MÉTODO DE CONTROLE DE PRAGAS". A presente invenção refere-se uma toxina praguicida consistindo de polipeptídeo não natural, sendo também revelados uma construção gênica, um processo de produção de praguicida, uma composição praguicida e um método de controle de pragas.

Relatório Descritivo

Toxina Praguicida, Construção Gênica, Processo de Produção de Praguicida,
Composição Praguicida, Método de Controle de Pragas

5 Campo da Invenção

A presente invenção refere-se genericamente a praguicidas. Mais especificamente, a presente invenção se refere a uma toxina praguicida derivada de um polipeptídeo não natural obtido através da truncagem da(s) seqüência(s) gênica(s) da família urease fusionado(s), ou não, a seqüência correspondente a um peptídeo sinal de secreção ou a outras sequências peptídicas, que facilitem a detecção e/ou purificação (poli-histidinas). A presente invenção refere-se também a um processo de produção de praguicida, a uma composição praguicida e a um método de controle de pragas.

15

Antecedentes da Invenção

Os inseticidas químicos, devido aos efeitos nocivos comprovados à saúde humana e à natureza, vêm sendo substituídos por alternativas eficazes e mais saudáveis no combate às pragas agrícolas. Dentre as opções disponíveis, destacam-se os bioinseticidas. Os bioinseticidas são toxinas produzidas por plantas e/ou outros organismos com ação inseticida e/ou praguicida, como uma resposta natural aos ataques biológicos. A alternativa tradicional para a produção desses bioinseticidas é a síntese química de polipeptídeos em laboratório. Entretanto, essa síntese muitas vezes se torna inviável na prática, além de ser trabalhosa e cara. Uma alternativa para tais limitações surgiu através das inovações advindas da tecnologia do DNA recombinante, que possibilitou o desenvolvimento de organismos geneticamente modificados que expressam entomotoxinas, sendo os exemplos mais conhecidos e comercializados em alguns países a batata e o milho que expressam toxinas de *Bacillus thuringiensis*.

25
30

É conhecido na literatura científica que algumas proteínas da planta *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco) com atividade ureolítica e tóxica para

alguns insetos já foram isoladas e caracterizadas. Dentre as quais, se encontram a urease e a canatoxina (Carlini & Grossi-de-Sá, 2002).

A proteína canatoxina possui uma atividade inseticida contra besouros, como, por exemplo, o *Callosobruchus maculatus*, e percevejos, como o
5 *Rhodnius prolixus*, *Nezara viridula* e o *Dysdercus peruvianus*. O contato da proteína natural (pró-toxina) com as enzimas do trato digestivo do inseto-alvo permite a degradação da proteína ingerida até a formação de um ou mais fragmento(s) (peptídeo (s)) responsáveis pela atividade inseticida (Carlini *et al.*, 1997; Ferreira-daSilva *et al.*, 2000). Portanto, o efeito tóxico dessas proteínas
10 nos insetos depende da ingestão e do tipo de enzimas digestivas que o inseto-alvo possui.

Conforme mencionado anteriormente, o processo de produção de peptídeos entomotóxicos pode ser feito a partir da quebra da canatoxina purificada por enzimas obtidas de larvas do besouro *Callosobruchus*
15 *maculatus*. O material digerido e purificado através de métodos cromatográficos clássicos, descritos na patente brasileira PI 0003334, revela a presença de vários peptídeos inseticidas. Um desses peptídeos denomina-se pepcanatox e sua região N-terminal foi seqüenciada por GOMBAROVITS, 1999.

20 Na literatura científica também é possível encontrar estudos que medem os efeitos toxicológicos dos polipeptídeos canatoxina (proteína natural) e da urease (proteína natural). Em um desses trabalhos, foram realizados ensaios de curvas de sobrevivência de insetos hemípteras alimentados com os referidos polipeptídeos. A figura 1 (adaptado de Carlini & Grossi-de-Sá, 2002)
25 ilustra o resultado desse experimento utilizando o barbeiro, *Rhodnius prolixus* (a); o percevejo verde da soja, *Nezara viridula* (b); o percevejo manchador da maçã do algodão, *Dysdercus peruvianus* (c). Em outro trabalho (Adaptado de Ferreira-da Silva *et al.*, 2000), foi realizada separação cromatográfica em coluna de gel-filtração (Sephacryl S-200) do polipeptídeo canatoxina pré-digerido com enzimas de larvas de *C.maculatus*, conforme indicado no painel
30 esquerdo da figura 2. A mesma figura ilustra as frações correspondentes a

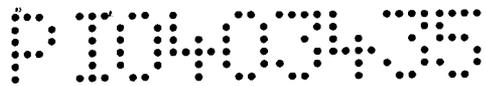
cada pico (A,C,D,E,F e G) que foram reunidas e ensaiadas para efeito inseticida em *R.prolixus*, conforme indicado no painel da figura 2.

Alguns exemplos de toxinas são fornecidos pela literatura patentária. A patente brasileira PI 0003334, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
5 descreve um peptídeo entomotóxico da canatoxina de feijão de porco (*Canavalia ensiformis*), obtido através da hidrólise controlada da proteína canatoxina com enzimas catepsinas (B+D) do besouro *Callosobruchus maculatus*, seguida de uma etapa de purificação por metodologia cromatográfica. Entretanto, o referido método apresenta a dificuldade de
10 obtenção de um peptídeo ativamente tóxico em grande quantidade devido às perdas processuais inerentes à metodologia empregada.

As patentes norte-americanas US 5,545,565 e US 5,877,306 de Plant Genetic Systems N. V., descrevem a construção de plantas geneticamente modificadas expressando genes correspondentes a proteínas tóxicas de
15 *Bacillus thuringiensis* que conferem resistência a insetos, sob o comando de promotores planta-específicos. Nos referidos documentos, a possibilidade de defesa contra a ação insetívora ocorre através da construção da planta resistente. Nessa patente, a entomotoxina se enquadra no grupo das delta-endotoxinas, que são eficientes para o controle de uma população restrita de
20 insetos.

A patente britânica GB 021,880,494 de Ciba-Geigy AG, relata a construção de vetores de expressão para a proteína MGE-1 de *Bacillus thuringiensis*, ou de porções truncadas da mesma, que conferem atividade inseticida e/ou pesticida, seguida de transformação de *S. cerevisiae* ou *E. coli*.
25 A proteína com atividade inseticida pode ser colocada em contato com um inseto da ordem *Lepidoptera* ou no ambiente no qual o inseto habita. Nessa patente, a entomotoxina se enquadra no grupo das delta-endotoxinas, que são muito eficientes para o controle de uma população restrita de insetos.

A patente norte-americana US 6,180,774 de Monsanto Company,
30 propõe um método de modificação da seqüência nucleotídica que aumenta o acúmulo da proteína correspondente nas plantas monocotiledôneas modificadas geneticamente. Além disso, revela um conjunto de genes para a



proteína inseticida de *Bacillus thuringiensis* utilizados na transformação de monocotiledôneas. Nessa patente, a entomotoxina também se enquadra no grupo das delta-endotoxinas muito eficientes contra o controle de uma população restrita de insetos.

5 O pedido internacional de patente WO 99/58695, do Instituto de Pesquisa Agronômica da França e do Instituto Nacional das Ciências Aplicadas de Lyon, descreve um polipeptídeo ou isoformas do mesmo oriundo da albumina PA1b de leguminosas, com função inseticida. Cereais modificados geneticamente e contendo esses genes possuem grãos e produtos derivados
10 protegidos contra insetos do tipo carunchos (da ordem Coleópteros) e pulgões (da ordem Homópteros). Nessa patente, a entomotoxina se enquadra no grupo de toxina muito eficiente contra o controle de uma população restrita de insetos.

A patente norte-americana US 5,827,684 de Res Corp Technologies Inc
15 descreve a produção de, no mínimo, um polipeptídeo tóxico de *Bacillus* em levedura metilotrófica, a partir da introdução de vetores de expressão próprios. Preferencialmente, esse trabalho utiliza a levedura *Pichia pastoris* como organismo hospedeiro para a expressão. Adicionalmente, o efeito toxicológico decorrente do invento ocorre mediante a ingestão das leveduras, utilizadas
20 como alimento pelas larvas sensíveis. Entretanto, esta entomotoxina se enquadra no grupo das delta-endotoxinas muito eficientes para o combate de uma população restrita de insetos.

O pedido internacional de patente WO 01/59146, da Universidade de Connecticut, revela seqüências de ácidos nucléicos e de aminoácidos
25 correspondentes a uma toxina inseticida retirada do *Hydronyche versuta* (espécie de aranha), que é responsável por inibir o canal de cálcio do organismo sensível. As seqüências do pedido WO 01/59146 não apresentam similaridade com as seqüências da presente invenção.

O pedido internacional de patente WO 98/22595, de ECOGEN Inc.,
30 revela um conjunto de proteínas quiméricas baseadas nas seqüências de delta-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*, apresentando características inseticidas contra uma população restrita de insetos.

O pedido de patente brasileiro PI 9714150 revela um método de controle de insetos através da alimentação ou do contato com células de plantas monocotiledôneas geneticamente modificadas contendo o gene para peroxidase. Nesse documento, pode ser realizado o co-cultivo das células vegetais com outros genes inseticidas. Nesse documento, a entomotoxina apresenta características inseticidas contra uma população restrita de insetos.

O pedido de patente brasileiro PI 9809516, da Universidade de Oklahoma e da Pioneer Hi-Breed International, Inc., reivindica uma seqüência de nucleotídeo para a Pentin-1 de leguminosa do gênero *Pentaclethra*, uma seqüência que tenha 90% de identidade e uma seqüência que hibridize em condições estridentes com a Pentin-1. A proteína Pentin-1 da referida invenção é responsável por causar a morte de insetos, principalmente dos insetos do gênero *Diabrotica*, além de outros organismos. Desta forma, derivados naturais ou artificiais desta proteína, bem como seu(s) gene(s), podem ser usados, principalmente, no controle do complexo de pragas de raiz de milho, como por exemplo, os insetos do gênero *Diabrotica*. Nesse documento, a entomotoxina apresenta características inseticidas contra uma população restrita de insetos.

O pedido de patente brasileiro PI 0010303, de Monsanto Co., revela a utilização de polipeptídeos inseticidas delta-endotoxinas ou de fragmentos dos mesmos responsáveis por controlar a população de besouros (ordem Coleópteros) presente nas plantas e em suas progênies. O referido documento também propõe a construção de plantas geneticamente modificadas para estes polipeptídeos, a aplicação dos referidos polipeptídeos na forma pulverizada, solúvel ou granuladas, além de um kit para a detecção de seqüências correspondentes às delta-endotoxinas.

Contudo, a presente invenção contorna as deficiências contidas nos documentos citados, pois permite o controle da população de insetos não susceptíveis aos efeitos da delta-endotoxina, através do uso de toxinas praguicidas derivadas de um polipeptídeo não natural da família gênica das ureases. As toxinas praguicidas da presente invenção controlam a população de insetos e de outras pragas. Além disso, para efeitos da presente invenção,

pragas são todos os organismos que não são desejáveis ao ambiente. As toxinas da presente invenção são denominadas de jaburetox. As toxinas praguicidas, para a presente invenção, correspondem a polipeptídeos tóxicos praguicidas. Tais polipeptídeos são derivadas de proteínas naturais já conhecidas, as ureases, que apresentam a limitação de somente serem ativas quando clivadas após sua ingestão, o que acarreta dificuldades de uso e limitações quanto à sua cinética de eficácia. Para efeitos da presente invenção, a proteína tóxica polipeptídica compreende adicionalmente seqüências de outras proteínas que facilitem as etapas subseqüentes de obtenção da mesma.

Os polipetídeos tóxicos praguicidas da presente invenção não são encontrados na natureza e correspondem a versões truncadas das proteínas naturais, sendo utilizadas em suas respectivas formas ativas e estáveis, permitindo que insetos incapazes de realizar a quebra total ou adequada das proteínas naturais também possam ser controlados. Desta forma, os polipetídeos tóxicos praguicidas da presente invenção apresentam um espectro de insetos-alvo maior que o apresentado no estado da técnica. Adicionalmente, o processo de produção preferencial dos referidos polipetídeos tóxicos praguicidas é a utilização de um sistema heterólogo de expressão, que facilita sua obtenção em escala industrial e permite a secreção dos mesmos em grande quantidade e para o meio extracelular.

Sumário da invenção

É um objeto da presente invenção proporcionar uma toxina praguicida consistindo de um polipeptídeo não natural obtido através da truncagem da(s) seqüência(s) gênica(s) da família urease. Para efeitos da presente invenção, o termo "toxina praguicida" compreende toxinas para controlar a população de insetos e de outras pragas. Para efeitos da presente invenção, o termo "praga" compreende organismos que não são desejáveis, preferencialmente insetos.

Em outro aspecto da presente invenção, foi desenvolvida uma construção gênica para a expressar um polipetídeo com propriedade biológica tóxica para as pragas. É, portanto, um outro adicional objeto da presente

invenção proporcionar uma construção gênica útil para expressão do referido polipeptídeo tóxico para pragas em um organismo hospedeiro apropriado.

É um adicional objeto da presente invenção fornecer um processo de produção de um praguicida caracterizado por compreender a expressão, e em
5 um organismo hospedeiro adequado, da construção gênica da presente invenção.

Em um adicional aspecto da presente invenção, foi desenvolvida uma composição contendo o polipeptídeo da presente invenção. É, portanto um objeto da presente invenção, fornecer uma composição praguicida
10 compreendendo pelo menos um polipeptídeo da presente invenção.

Em um diferente aspecto, foi desenvolvido um método para controle de pragas que utiliza a composição descrita pela presente invenção. É, portanto, um objeto da presente invenção, proporcionar um método de controle de pragas compreendendo o uso de uma composição praguicida da presente
15 invenção.

Estes e outros aspectos da presente invenção ficarão mais evidentes a partir da descrição detalhada da invenção e das reivindicações providas abaixo.

20 **Breve Descrição das Figuras**

As figuras 1, 2A e 2B ilustram os resultados dos bioensaios da atividade inseticida realizados com canatoxina (proteína natural), urease (proteína natural) e com o peptídeo pepcanatox (proteína já ativada, correspondente ao fragmento da proteína natural).

25 A figura 3 representa os plasmídios pPIC9K contendo os DNA de cassete de expressão codificantes para os fragmentos inseticidas das proteínas urease e J-BURE II, aqui denominados jaburetox.

As figuras 4 A e B representam o bioensaio de administração oral da canatoxina (proteína natural) e do peptídeo jaburetox-2 (proteína ativa) em
30 ninfas de 2º. estágio de *D. peruvianus* (fig 4A) e de *A. gemmatalis* (fig 4B).

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção refere-se a um método alternativo de produção de toxinas praguicidas que consistem de polipeptídeos truncados da família uréase, por expressão heteróloga. Na presente invenção, o termo "praguicida" compreende o controle de insetos e outras pragas indesejáveis. A expressão heteróloga da presente invenção compreende a expressão de fragmento(s) do gene JBURE-II (GenBank AF468788/ Seq. No.3) e/ou do gene urease (GenBank M65260/ Seq. No.4) e/ou de outros da mesma família que codificam proteínas com propriedades biológicas inseticida e praguicida.

A presente invenção se refere ao polipeptídeo recombinante obtido do gene JBURE-II, denominado jaburetox-2 (Seq. No.1) que apresenta atividade inseticida para o percevejo da maçã do algodoeiro, *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera), bem como contra a lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidóptera), sendo inócuo para ratos neonatos ou camundongos, se ingerido ou injetado intraperitonealmente. A presente invenção também se refere ao polipeptídeo recombinante obtido pelo gene urease (Seq. No.2).

A presente invenção inclui adicionalmente, a produção de polipeptídeos com atividade praguicida produzidos a partir de outros genes da mesma família de proteínas (ureases) isolados de outras plantas ou obtidos a partir de outros genes, com similaridade igual ou superior a 50% e/ou identidade superior a 40% a estes polipeptídeos, bem como os usos praguicidas que possam vir a serem descritos para os mesmos. Outros componentes polipeptídicos descritos na presente invenção podem ser usados sozinhos ou em combinação com proteínas ou agentes para controlar diferentes tipos de pragas de insetos. As outras proteínas compreendem as proteínas de *Bacillus*, proteínas inseticidas vegetais, inibidores de proteases, inibidores de alfa-amilases, lectinas, peroxidases, oxidase de colesterol e similares.

Os exemplos descritos a seguir ilustram, mas não limitam a presente invenção.

Exemplos

Exemplo 1 - Isolamento das seqüências da família gênica urease e construção dos vetores de expressão de *Pichia pastoris* contendo as mesmas.

A. Isolamento das seqüências da família gênica urease

O cDNA codificante para o polipeptídeo tóxico jaburetox-2 da presente invenção foi obtido por amplificação através da reação da polimerase em cadeia (PCR) utilizando o ligonucleotídeos iniciadores desenhados a partir da seqüência conhecida do gene JBURE-II e do polipeptídeo inseticida pepcanatox. A mesma estratégia serve para obtenção do cDNA codante de outros polipeptídeos tóxicos a partir da seqüência, parcial ou total, dos genes de isoformas de urease, presentes no feijão-de-porco, bem como em outras plantas. A utilização dessa estratégia possibilitou a utilização da região ativa correspondente à região inseticida da proteína ureolítica.

B. Construção do vetor de expressão de *Pichia pastoris* contendo as seqüências da família gênica urease

O fragmento resultante da amplificação do cDNA sofreu inicialmente, uma reação de digestão com as enzimas de restrição *Sna*BI e *Eco*RI, em seguida, foi purificado por eletroforese em gel de agarose 1% e posteriormente, introduzido no plasmídeo pPic9K de expressão em levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. Este vetor possui a região 5' do promotor forte AOX1, induzido por metanol como única fonte de carbono, uma seqüência sinal de secreção, o fator α de acasalamento que permite a secreção da proteína para o meio extracelular, o gene HIS4, que possibilita que a levedura *P. pastoris* deficiente neste gene cresça em meio mínimo sem histidina e o gene que confere resistência à ampicilina, quando a construção é utilizada em bactérias, e a região de terminação da transcrição – 3'AOX1 (TT). A figura 3 ilustra os vetores pPIC9K /J-BURE II e pPIC9K /UREASE contendo conforme descrito anteriormente, os componentes do cassete de expressão da presente invenção. Entretanto, a região promotora da presente invenção pode ser nativa ou análoga ou heteróloga à célula hospedeira. Adicionalmente, o promotor pode ser de seqüência natural ou alternativamente de seqüência sintética, não se restringindo ao mencionado anteriormente. Nesse cassete de expressão da

presente invenção outros genes marcadores para seleção, bem como, seqüências regulatórias para aumentar a expressão e seqüências sinalizadoras de localização subcelular, podem ser adicionados ou retirados, dependendo do organismo hospedeiro em questão.

5 Para a realização de experimentos em que há o envolvimento de inserções, deleções ou substituições, como no caso das técnicas de mutagênese *in vitro*, de reparo de iniciadores, de restrição, de anelamento, de ligação, de PCR, dentre outras, seqüências adaptadoras podem ser adicionadas ao cassete de expressão da presente invenção.

10

Exemplo 2 - Transformação das leveduras *Pichia pastoris* com pPic9K/ URE II e pPic9K/ UREASE e seleção das mesmas

A. Transformação das leveduras *Pichia pastoris* com pPic9K/URE II e pPic9K/UREASE

15 O plasmídeo resultante da presente invenção foi usado para transformar a bactéria *E. coli*. Posteriormente, o DNA plasmidial foi isolado da *E. coli*, sofreu reação de digestão com *Sall* e em seguida, foi inserido no genoma da levedura *P. pastoris* GS115 por eletroporação. A inserção no genoma ocorre através de recombinação homóloga das regiões terminais 5' e 3' do cassete de
20 expressão com o gene alvo, no caso, o gene AOX1.

B. Seleção das leveduras *Pichia pastoris*

As cepas transformantes foram selecionadas em meio deficiente em histidina, sendo em seguida crescidas em meio líquido para o início da expressão heteróloga do peptídeo. Após 96 horas de indução da expressão
25 com metanol, foi observada por eletroforese em gel a 18 % poliacrilamida corado com prata, a presença no sobrenadante da cultura de uma banda em torno de 10 kDa, representando os polipeptídeos recombinantes.

Exemplo 3 - Purificação de toxinas praguicidas produzidas por *P. pastoris*
30 transformada.

A. Purificação de toxinas praguicidas obtidas por expressão em *P. pastoris* transformada.

Na metodologia empregada da presente invenção a presença do peptídeo sinal de secreção permite que haja uma clivagem do polipeptídeo recombinante e uma conseqüente liberação para o meio extracelular do polipeptídeo tóxico para pragas. Dessa forma, a purificação do polipeptídeo tóxico é facilitada para os experimentos posteriores de bioensaios.

Para a realização do ensaio biológico da presente invenção, o sobrenadante da cultura foi submetido à diálise contra água destilada em membrana com corte de 3.000, e em seguida, em membrana com corte de 30.000. O material obtido como ultrafiltrado na segunda diálise foi liofilizado, e o pó obtido foi utilizado para bioensaios em ratos e insetos.

A maioria dos polipeptídeos recombinantes secretados por *P. pastoris* são glicosiladas o que poderia acarretar alguma modificação biológica das mesmas, no entanto, os polipeptídeos tóxicos para pragas da presente invenção não foram alterados quanto a sua toxicidade aos insetos.

Exemplo 4 - Bioensaios para a atividade das toxinas praguicidas

A. Bioensaios para a atividade das toxinas praguicidas

O peptídeo recombinante obtido do gene JBURE-II, denominado jaburetox-2, apresenta atividade tóxica para o percevejo da maçã do algodoeiro, *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera), bem como contra a lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidóptera), conforme está representado na figura 4. Essa figura representa a comparação do efeito inseticida da canatoxina (proteína natural) e do polipeptídeo jaburetox-2 (polipeptídeo recombinante) administrados por via oral, ao final de 5 dias. Os polipeptídeos da presente invenção foram incorporados nas dietas artificiais dos respectivos insetos, na concentração final de 0,01% (A280 por g dieta). Nesse experimento, as ninfas de 2º. estágio de *D. peruvianus* (fig 4A) e de *A. gemmatalis* (fig 4B) receberam dietas artificiais contendo as substâncias-teste e foram acompanhadas durante 5 dias. Em *D. peruvianus* foi observado que o efeito inseticida do polipeptídeo é mais rápido do que a da proteína natural. Para *A. gemmatalis*, que possui sistema digestivo com enzimas tipo tripsina, observa-se que a proteína natural é inativa e não possui efeito toxicológico,

enquanto que o polipeptídeo jaburetox-2, na dose testada, apresenta ação inseticida em cerca de 50% dos indivíduos (figuras 4 A e B).

Para ensaios de toxicidade em ratos neonatos e camundongos, soluções de NaCl 0.15 M contendo o peptídeo tóxico foram administradas via oral ou parenteral em doses de até 10 mg por Kg de peso vivo do animal. O resultado desse experimento revelou que a presente composição bioinseticida e/ou pesticida não apresenta toxicidade aos mamíferos.

A presente invenção pode ser usada para proteger espécies agrícolas e produtos derivados de ataque de pestes através da introdução de um vetor adequado em um hospedeiro microbiológico, seguida da aplicação do referido hospedeiro no ambiente e/ou em plantas. Adicionalmente, a presente invenção pode ser manipulada e usada para ser expressa em uma variedade de organismos incluindo organismos hospedeiros procariotas e eucariotas, inclusive em plantas, desde que sejam feitas as modificações por aqueles versados na técnica. A composição da presente invenção pode ser produzida na forma em pó, granulada, comprimido ou solúvel. A aplicação da mesma pode ocorrer tanto na zona rural, na agricultura quanto na zona urbana, como um inseticida doméstico. Os versados na área apreciarão que a presente invenção também abrange outros métodos de produção de polipeptídeos derivados de urease, bem como outras formas de utilização dos mesmos, desde que compreendidos no espírito da invenção e no escopo das reivindicações anexas.

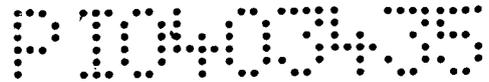
Reivindicações

Toxina Praguicida, Construção Gênica, Processo de Produção de Praguicida,
Composição Praguicida, Método de Controle de Pragas

- 5 1. Toxina praguicida caracterizada pelo fato da referida toxina ser um polipeptídeo não natural compreendendo seqüências polipeptídicas que correspondem às seqüências gênicas truncadas do polipeptídeo da família urease.
2. Toxina praguicida, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo
10 fato do referido polipeptídeo não natural compreender pelo menos uma região ativa do polipeptídeo natural da família urease.
3. Toxina praguicida, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato do referido polipeptídeo não natural compreender uma região da proteína J-BURE II de 50 a 150 aminoácidos.
- 15 4. Toxina praguicida, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato do referido polipeptídeo não natural compreender uma região da proteína J-BURE II de 81 a 95 aminoácidos.
5. Toxina praguicida, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo
20 fato do referido polipeptídeo não natural compreender a região da proteína J-BURE II de 95 aminoácidos da SEQ. No. 1.
6. Toxina praguicida, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato do referido polipeptídeo não natural compreender uma região da proteína UREASE de 50 a 150 aminoácidos.
7. Toxina praguicida, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo
25 fato do referido polipeptídeo não natural compreender preferencialmente, uma região da proteína UREASE de 81 a 95 aminoácidos.
8. Toxina praguicida, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato do referido polipeptídeo não natural compreender a região da proteína UREASE de 95 aminoácidos da SEQ. No. 2.
- 30 9. Toxina praguicida, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato do referido polipeptídeo não natural compreender seqüências que

apresentam similaridade igual ou superior a 50% ao polipeptídeo das SEQs No. 1 e 2.

- 5 10. Toxina praguicida, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato do referido polipeptídeo não natural compreender seqüências que apresentam identidade superior a 40% em relação ao polipeptídeo das SEQs No. 1 e 2.
11. Toxina praguicida, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato do referido polipeptídeo não natural compreender adicionalmente outra seqüência polipeptídica.
- 10 12. Toxina praguicida, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato da referida seqüência polipeptídica adicional ser uma seqüência polipeptídica que facilite a etapa de purificação da mesma.
13. Toxina praguicida, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato da referida seqüência polipeptídica adicional compreender uma seqüência polipeptídica que facilite a etapa de exportação da mesma.
- 15 14. Toxina praguicida, de acordo com as reivindicações 11 a 13, caracterizada pelo fato da referida seqüência polipeptídica adicional compreender uma seqüência de um peptídeo sinal de secreção para o meio extracelular.
- 20 15. Toxina praguicida, de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato da referida seqüência polipeptídica adicional compreender o fator α de *S. cerevisiae*.
16. Toxina praguicida, de acordo com as reivindicações 11 a 15, caracterizada pelo fato da referida seqüência polipeptídica adicional compreender um polímero de histidina.
- 25 17. Toxina praguicida, de acordo com as reivindicações 11 a 16, caracterizada pelo fato da referida seqüência polipeptídica adicional compreender outra seqüência polipeptídica tóxica.
- 30 18. Toxina praguicida, de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato da referida seqüência polipeptídica tóxica ser selecionada do grupo de que consiste de proteínas de *Bacillus thuringiensis*, inibidores de



proteases, inibidores de alfa-amilases, lectinas, peroxidases, oxidases de colesterol e combinações dos mesmos.

- 5 19. Construção gênica útil para a expressão de toxina praguicida caracterizada por compreender pelo menos uma seqüência capaz de codificar um polipeptídeo não natural ativo como praguicida, sendo que a referida construção compreende seqüência gênica truncada correspondente a polipeptídeo da família urease.
- 10 20. Construção gênica, de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato da referida seqüência gênica truncada compreender uma região de 150 a 500 nucleotídeos da seqüência gênica J-BURE II.
21. Construção gênica, de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato da referida seqüência gênica truncada compreender uma região de 308 pares de base da seqüência gênica J-BURE II da SEQ. No.3.
- 15 22. Construção gênica, de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato da referida seqüência gênica truncada compreender uma região de 150 a 500 nucleotídeos da seqüência gênica da urease.
23. Construção gênica, de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato da referida seqüência gênica truncada compreender uma região de 308 pares de base da seqüência gênica J-BURE II (SEQ. No.4).
- 20 24. Construção gênica, de acordo com a reivindicação 19, caracterizada por adicionalmente compreender seqüência codificante de outro polipeptídeo.
- 25 25. Construção gênica, de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato da referida seqüência adicional compreender uma seqüência codificante de polipeptídeo que facilite a etapa de purificação da mesma.
26. Construção gênica, de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato da referida seqüência adicional compreender uma seqüência codificante de polipeptídeo que facilite a etapa de exportação da mesma.
- 30 27. Construção gênica, de acordo com as reivindicações 25 ou 26, caracterizada pelo fato da referida seqüência adicional compreender uma seqüência codificante para um peptídeo sinal de secreção para meio extracelular.

28. Construção gênica, de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato do referido peptídeo sinal ser o fator α de *S. cerevisiae*.
29. Construção gênica, de acordo com a reivindicação 27, caracterizada por compreender adicionalmente outra sequência codificante para peptídeo sinal de secreção extracelular.
- 5 30. Construção gênica, de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato do peptídeo sinal adicional compreender uma sequência codificante para o polímero de histidina.
- 10 31. Construção gênica, de acordo com as reivindicações 19 a 30, caracterizada por adicionalmente compreender outra sequência codificante para proteína tóxica.
- 15 32. Construção gênica, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato da referida sequência adicional ser selecionada do grupo que consiste de seqüências codificantes para proteínas de *Bacillus thuringiensis*, inibidores de proteases, inibidores de alfa-amilases, lectinas, peroxidases, oxidases de colesterol e combinações das mesmas.
- 20 33. Construção gênica, de acordo com as reivindicações 19 a 32, caracterizada pelo fato da referida seqüência fusionada estar inserida em um cassete de expressão.
34. Construção gênica, de acordo com a reivindicação 33, caracterizada pelo fato do referido cassete de expressão compreender:
- (a) um segmento promotor;
 - (b) uma seqüência nucleotídica correspondente à marca seletiva e;
 - (c) uma seqüência nucleotídica terminadora de transcrição.
- 25 35. Construção gênica, de acordo com a reivindicação 34, caracterizada pelo fato do referido segmento promotor compreender qualquer seqüência promotora que permita a transcrição da seqüência gênica codificante para o referido polipeptídeo.
- 30 36. Construção gênica, de acordo com a reivindicação 35, caracterizada pelo fato do referido segmento promotor compreender a seqüência promotora GAP correspondente a um promotor forte e constitutivo.

37. Construção gênica, de acordo com a reivindicação 35, caracterizada pelo fato do referido segmento promotor ser a seqüência promotora AOX1 induzida por metanol.
- 5 38. Construção gênica, de acordo com a reivindicação 34, caracterizada pelo fato da referida marca compreender qualquer seqüência que permita a seleção do organismo hospedeiro.
- 10 39. Construção gênica, de acordo com a reivindicação 38, caracterizada pelo fato da referida marca seletiva ser selecionada do grupo que compreende o gene HIS4, os genes de resistência ao antibiótico ampicilina, kanamicina, à droga zeocina, ou combinações dos mesmos.
40. Construção gênica, de acordo com a reivindicação 34, caracterizada pelo fato da referida região terminadora de transcrição compreender qualquer seqüência que permita o término de transcrição no respectivo organismo hospedeiro.
- 15 41. Construção gênica, de acordo com a reivindicação 40, caracterizada pelo fato da referida região terminadora de transcrição compreender a região terminadora do gene AOX1.
- 20 42. Construção gênica, de acordo com a reivindicação 33, caracterizada pelo fato do referido cassete compreender adicionalmente uma origem de replicação de bactéria.
43. Construção gênica, de acordo com as reivindicações 33 a 42, caracterizada pelo fato do referido cassete de expressão estar inserido em um vetor de expressão.
- 25 44. Construção gênica, de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato do referido vetor compreender o plasmídio circular pPIC9K.
- 30 45. Processo de produção de praguicida compreendendo a expressão heteróloga de uma toxina praguicida não natural caracterizado pelo fato de que o referido processo de produção compreende o cultivo de um organismo modificado geneticamente, contendo uma construção gênica que compreende pelo menos uma seqüência capaz de codificar um polipeptídeo não natural ativo como praguicida, sendo que a referida

construção compreende seqüências gênicas truncadas codificantes de polipeptídeos da família urease.

46. Processo, de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato do referido organismo compreender uma célula eucariótica.

5 47. Processo, de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato da referida célula eucariótica compreender células vegetais.

48. Processo, de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato da referida célula vegetal ser capaz de dar origem a plantas geneticamente modificadas.

10 49. Processo, de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato da referida célula eucariótica compreender um fungo.

50. Processo, de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato do referido fungo ser *Pichia pastoris*.

15 51. Processo, de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato da referida *Pichia pastoris* ser da linhagem GS115.

52. Processo, de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato do referido organismo compreender uma célula procariótica.

53. Processo, de acordo com a reivindicação 52, caracterizado pelo fato da referida célula procariótica compreender uma bactéria.

20 54. Processo, de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato da referida bactéria ser *E. coli*.

55. Composição praguicida caracterizada pelo fato de compreender um veículo e pelo menos um polipeptídeo não natural ativo correspondente a seqüências gênicas truncadas de polipeptídeo da família urease.

25 56. Composição, de acordo com a reivindicação 55, caracterizada pelo fato do referido veículo compreender diluentes solventes, agentes de superfície, espessantes, estabilizantes e misturas dos mesmos.

30 57. Composição, de acordo com a reivindicação 55, caracterizada pelo fato do referido veículo compreender formulações na forma líquida, granulada, em solução ou em pó.

58. Método de controle de pragas caracterizado pelo fato de compreender o uso de pelo menos uma toxina praguicida consistindo de um polipeptídeo não natural ativo correspondente a seqüências gênicas truncadas de polipeptídeo da família urease.
- 5 59. Método, de acordo com reivindicação 58, caracterizado pelo fato de compreender a aplicação de uma composição conforme as reivindicações 55 a 57.
- 10 60. Método, de acordo com a reivindicação 58, caracterizado pelo fato de compreender a expressão, em plantas transgênicas, de uma construção gênica conforme as reivindicações 19 a 44.

5

Listagem de Sequências

Dados do requerente:

(a) Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

(b) Endereço: UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Av. Paulo Gama, 110- Centro- Porto Alegre – RS

10

Título da Invenção: Toxina Praguicida, Construção Gênica, Processo de Produção de Praguicida, Composição Praguicida, Método de Controle de Pragas

15

Número de sequências constantes do pedido: 4

Seq. no. 1

tamanho: 95 aminoácidos

20

tipo: peptídeo

nome do peptídeo: JABURETOX – 2 (derivado do gene J-BURE-II)

função: inseticida-praguicida

25

Pro- Leu -Glu - Lys -Arg- Glu- Ala- Glu- Ala- Ile -Arg -Gly – Gly -Asn- Ala- Ile
Ala- Asp- Gly- Pro- Val-Asn- Glu- Ala- Asn- Cys- Lys- Ala- Ala- Met -Glu - Ile
Val- Cys- Arg- Arg-Glu -Phe -Gly -His -Lys -Glu -Glu -Glu -Glu –Ala-Ser- Glu
Gly- Val- Thr -Thr -Gly -Asp -Pro -Asp -Cys -Pro -Phe -Thr -Lys –Ala- Ile – Pro
Arg –Glu- Glu- Tyr- Ala- Asn-Lys - Tyr- Gly- Pro -Tyr -Ile -Gly - Asp -Lys -Ile
Arg-Leu- Gly- Asp -Thr -Asp -Leu -Ile -Ala - Glu -Ile -Glu -Lys -Asp- Phe –Ala

30

Leu ***

35

5 **Seq. no. 2**

tamanho: 95 aminoácidos

tipo: peptídeo

nome do peptídeo: JABURETOX-1 (derivado do gene de urease, JBURE-1)

10 função: inseticida-praguicida

Pro- Leu -Glu- Lys -Arg -Glu -Ala- Glu- Ala- Ile -Arg -Gly- Gly- Asn- Ala- Ile
 15 Ala- Asp- Gly- Pro- Val -Asn -Glu- Thr- Asn- Leu- Glu -Ala -Ala -Met- His -Ala
 Val -Arg -Ser -Lys -Gly -Phe- Gly- His -Glu -Glu -Glu -Lys- Asp- Ala -Ser -Glu
 Gly -Phe -Thr- Lys- Glu -Asp- Pro- Asn- Cys- Pro -Phe -Asn -Thr -Phe- Ile- His
 Arg -Lys- Gly -Tyr- Ala- Asn -Lys- Tyr- Gly- Pro -Tyr- Tyr -Gly -Asp- Lys- Ile
 Arg- Leu -Gly -Asp -Thr- Asn -Leu- Leu -Ala -Glu -Ile -Glu -Lys -Asp- Phe- Ala
 20 Leu -***

Seq. no. 3

tamanho: 308 pares de base

tipo: DNA complementar

25 nome: fragmento do gene J-BURE II

função: inseticida-praguicida

CCG CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT ATT AGA GGT GGT AAC GCC ATT 48

Pro- Leu -Glu - Lys -Arg- Glu- Ala- Glu- Ala- Ile -Arg -Gly - Gly -Asn- Ala- Ile

30

GCT GAT GGT CCA GTT AAT GAA GCC AAT TGT AAA GCA GCT ATG GAG ATT 96

Ala- Asp- Gly- Pro- Val-Asn- Glu- Ala- Asn- Cys- Lys- Ala- Ala- Met -Glu - Ile

GTG TGC AGA AGG GAA TTT GGA CAT AAG GAA GAA GAA GAA GCA AGT GAG 144

35 Val- Cys- Arg- Arg-Glu -Phe -Gly -His -Lys -Glu -Glu -Glu -Glu -Ala-Ser- Glu

5

GGT GTT ACC ACA GGA GAC CCT GAT TGT CCT TTC ACC AAA GCC ATT CCT 192
 Gly- Val- Thr -Thr -Gly -Asp -Pro -Asp -Cys -Pro -Phe -Thr -Lys -Ala- Ile - Pro

10

CGT GAA GAA TAT GCT AAC AAG TAT GGT CCG ACT ATT GGT GAC AAA ATC 240
 Arg -Glu- Glu- Tyr- Ala- Asn-Lys - Tyr- Gly- Pro -Tyr -Ile -Gly - Asp -Lys -Ile

CGT CTT GGT GAC ACT GAT TTG ATT GCT GAA ATT GAA AAG GAT TTC GCC 288
 Arg-Leu- Gly- Asp -Thr -Asp -Leu -Ile -Ala - Glu -Ile -Glu -Lys -Asp- Phe -Ala

15

TTG TAG GGT TGA GGA ATT CC 308

Leu ***

Seq. no. 4

tamanho: 308 pares de base

tipo: DNA complementar

20

nome: fragmento do gene JBURE-1

função: inseticida-praguicida

25

CCG CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT ATT AGA GGT GGT AAC GCC ATT 48
 Pro- Leu- Glu- Lys- Arg- Glu- Ala- Glu- Ala- Ile - Arg -Gly -Gly - Asn -Ala -Ile

GCT GAT GGT CCA GTC AAT GAA ACC AAT TTG GAA GCA GCC ATG CAT GCT 96
 Ala- Asp -Gly- Pro -Val- Asn -Glu -Thr -Asn -Leu -Glu -Ala -Ala - Met -His -Ala

30

GTG CGC TCA AAG GGG TTT GGA CAC GAG GAA GAG AAA GAT GCA AGT GAA 144
 Val - Arg - Ser -Lys -Gly -Phe -Gly - His -Glu - Glu -Glu -Lys -Asp -Ala -Ser -Glu

GGA TTT ACC AAG GAA GAC CCG AAC TGT CCT TTC AAC ACA TTC ATT CAT 192
 Gly -Phe Thr- Lys- Glu - Asp - Pro -Asn -Cys -Pro -Phe -Asn -Thr -Phe- Ile- His

35

CGT AAA GAA TAT GCA AAC AAG TAT GGT CCA ACT ACT GGT GAC AAA ATC 240

5 Arg - Lys -Gly -Tyr -Ala -Asn- Lys -Tyr -Gly- Pro- Tyr -Tyr -Gly -Asp- Lys- Ile

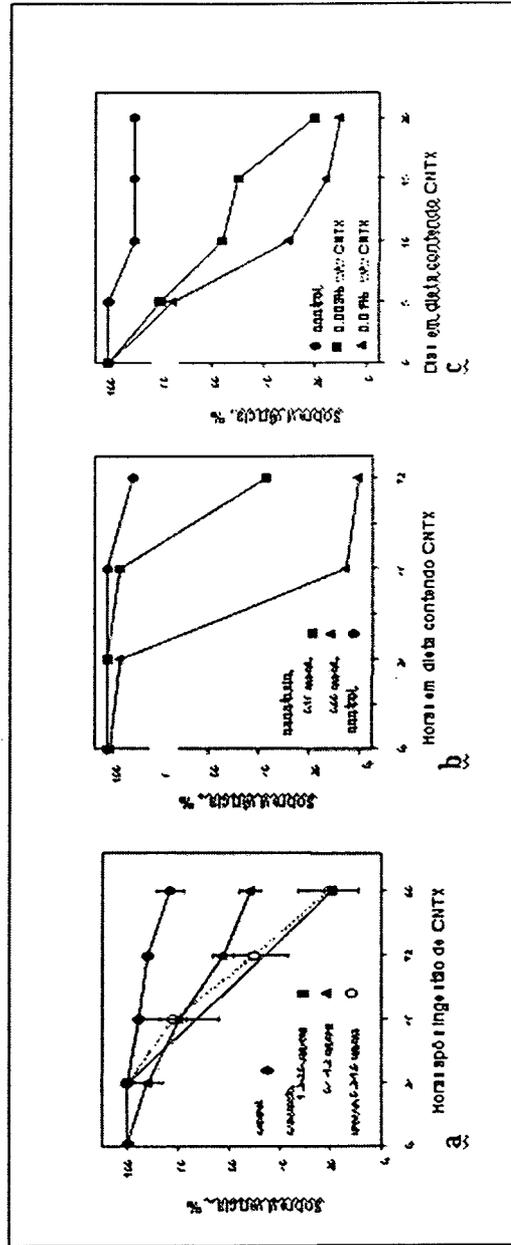
CGT CTT GGT GAC ACC AAT TTG TTG CGT GAA ATT GAA AAG GAT TTC GCC 288

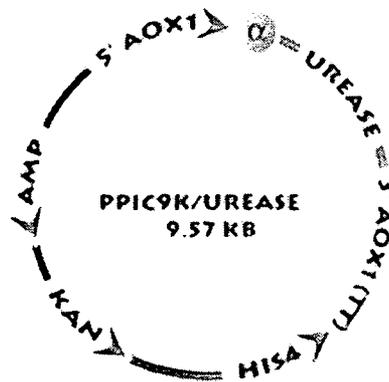
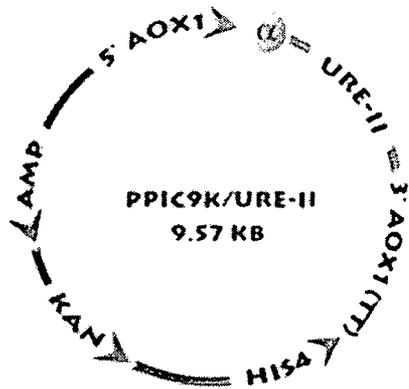
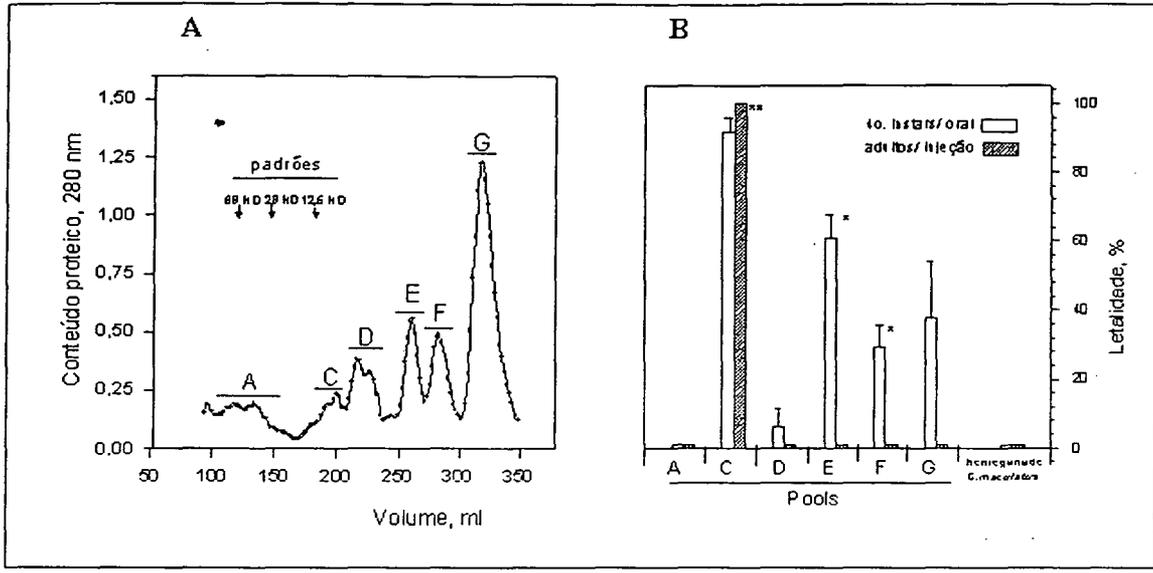
Arg -Leu- Gly- Asp -Thr -Asn -Leu -Leu -Ala Glu -Ile - Glu - Lys -Asp- Phe- Ala

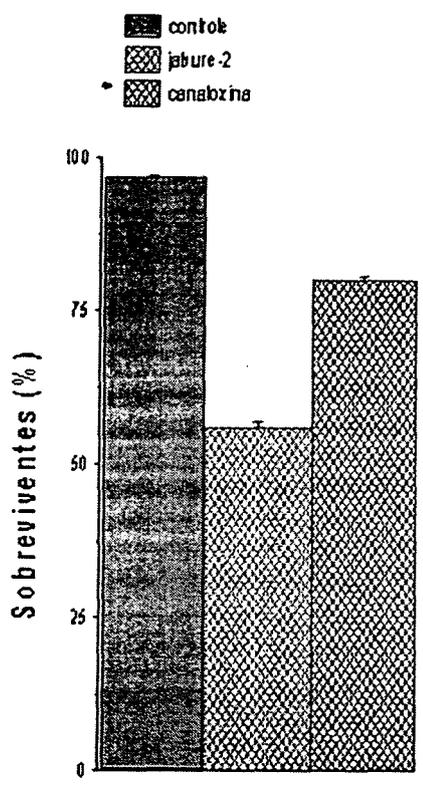
10 TTG TAG GGT TGA GGA ATT CC 308

Leu ***

15

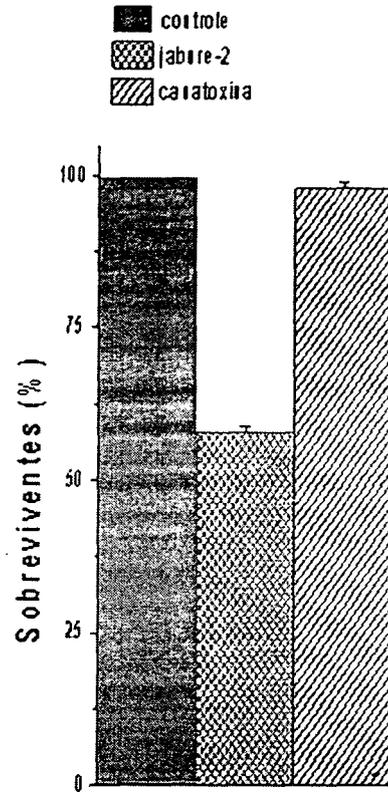






Dysdercus peruvianus

(A)



Anticarsia gemmatalis

(B)

Resumo

Toxina Praguicida, Construção Gênica, Processo de Produção de Praguicida,
Composição Praguicida, Método de Controle de Pragas

- 5 A presente invenção refere-se uma toxina praguicida consistindo de polipeptídeo não natural, sendo também revelados uma construção gênica, um processo de produção de praguicida, uma composição praguicida e um método de controle de pragas.