

» Consultar por: [Base Patentes](#) | [Finalizar Sessão](#)

Depósito de pedido nacional de Patente

(21) Nº do Pedido: PI0003334-0 A2

[Leia-me antes](#)

(22) Data do Depósito: 06/06/2000

(51) Classificação: C07K 1/12

(54) Título: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO ENTOMOTÓXICO DA CANATOXINA SUMÁRIO

"PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO ENTOMOTÓXICO DA CANATOXINA". (Comercialmente designado por pepcanatox),

(57) Resumo: obtido por hidrólise enzimática controlada da proteína, por catepsinas (B+D) isoladas de larvas do bruquídeo *Calosobruchus maculatus*.

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

(72) Nome do Inventor: [Celia Regina Ribeiro da Silva Carlini](#)  / Cláudio Teixeira da Silva Ferreira / Maria Emília Caciono Gombarovits

(74) Nome do Procurador: Paulo Afonso Pereira Cons. em Marcas e Patentes Ltda. S/C

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO ENTOMOTÓXICO DA CANATOXINASUMÁRIO

O seguinte relatório descritivo da patente de invenção refere-se ao desenvolvimento do processo de produção de peptídeo entomotóxico a partir da canatoxina (comercialmente designado por pepcanatox), obtido por hidrólise enzimática controlada da proteína, por catepsinas (B+D) isoladas de larvas do bruquídeo *Callosobruchus maculatus*.

PRODUÇÃO DO PEPTÍDEO ENTOMOTÓXICO

A canatoxina é uma proteína tóxica isolada de sementes de feijão-de-porco (*Canavalia Ensiformis*) por nosso grupo em 1981 (Carlini & Guimarães), *Toxicon* 19:667-676, 1981). A proteína (dímero com subunidades de 95 kDa) apresenta uma série de efeitos farmacológicos em células isoladas de mamíferos, ou ser administrada por via intraperitoneal em ratos e camundongos, mas é inativa nesses animais se dada por via oral (Carlini & Guimarães, *Toxicon* 27:791-806, 1991). Recentemente, descrevemos os efeitos inseticidas da canatoxina ingerida por insetos que apresentam catepsinas como as principais enzimas digestivas, como o Bruquídeo *Callosobruchus Maculatus* e o hemíptera *Rhodnius Prolixus*, com uma DL 50 de ca. 2 mg proteína/mg de inseto neste último modelo (Carlini et al., *J. Econ. Entomol.* 90,340-348, 1997). A toxina mostrou-se aparentemente inócua para insetos com digestão baseada em tripsinas; este dado, somado a outros, sugeriram uma ativação proteolítica da canatoxina pelas catepsina digestivas como uma etapa necessária para a expressão do efeito inseticida (Carlini et al., *J. Econ. Entomol.* 90,340-348, 997). A clonagem dos genes

codificantes da canatoxina já está esta em andamento, visando as potenciais aplicações biotecnológicas dessa proteína para a construção de plantas transgênicas resistentes a pragas.

OBJETIVO

5 O objeto do presente pedido de patente refere-se ao processo de produção de um peptídeo entomotóxico da canatoxina, obtido por hidrólise enzimática controlada da proteína, por catepsinas (B+D) isoladas de larvas do bruquídeo *Callosobruchus maculatus*. Para tanto, a canatoxina preparada em tampão volátil de pH 5,6, sendo incubada por 18 horas a 37°C com um
10 preparado obtido de larvas de 21 dias de *C. maculatus*, na razão de 0,5 mg azocaseinólíticas/micrograma de toxina. A mistura de fragmentos resultantes é fracionada por gel-filtração em coluna de Sephacryl S-100 e por cromatografia de fase reserva (FPLC, coluna PepRPC). Um dos peptídeos obtidos, apresentando cerca de 10 kDa, mostrou-se tóxico por via oral tanto
15 para o próprio bruquídeo, como para o hemíptera *Rhodnius prolixus*, afetando inclusive a fase adulta desse inseto, que se mostra resistente à ingestão da canatoxina intacta, aparentemente por falta de enzimas digestivas para processá-la. Tanto a canatoxina, como o peptídeo entomotóxico, agora designado como pepcanatox, não mostraram qualquer
20 efeito inibitório sobre as proteínas digestivas desses insetos.

APLICAÇÕES

Por se tratar de um peptídeo entomotóxico da canatoxina (composto constituído de aminoácidos, produzido sinteticamente ou formado por hidrólise de proteínas isoladas a partir de insetos, mais especificamente

de larvas bruquídeo *Callosobruchus maculatus*), tem-se como principal aplicação na elaboração de um bioinseticida contra pragas agrícolas, seguro para o meio ambiente, uma vez que se trata de um composto dedicado.

ASPECTOS IMPORTANTES

5 O espectro de ação inseticida da canatoxina e seu peptídeo entomotóxico, pepcanatox, cobre um grupo de insetos não suscetíveis aos efeitos das delta-endotoxinas de *Bacillus huringiensis*. Outros aspectos importantes a serem destacados são:

- 1) O pepcanatox é bastante estável, o que permitiu o desenvolvimento de
10 formulações para sua aplicação diretamente nas culturas agrícolas;
- 2) O pepcanatox apresenta um espectro de ação inseticida mais amplo, com menores limitações de espécie-especificidade se comparada às toxinas Bt, e atuando inclusive em insetos incapazes de processar (totalmente ou adequadamente) a canatoxina intacta.

15 OUTROS ASPECTOS

Determinados problemas relacionados à canatoxina e ao seu peptídeo entomotóxico estão sendo trabalhados, de modo a permitir a solução, a curto prazo (seis a doze meses), de algumas questões importantes, como:

- 20 a) Sequenciamento do peptídeo entomotóxico;
- b) Espectro de atividade entomotóxica do pepcanatox em vários insetos-pragas, tanto com digestão baseada em catepsinas (hemípteras: *Nezara viridula* e *Dysdercus peruvianus*; bruquídeos: *Zabrotes subfasciatus* e *Acanthosceles obtectus*) como em tripsinas (lepidópteros: *Anticarsia*



gemmatalis, *Spodoptera frugiperda*);

- c) Análise preliminar de atividades farmacológicas do pepcanatox por administração oral e intraperitoneal em ratos e camundongos; e,
- d) Clonagem dos genes da canatoxina e localização da seqüência relativa ao peptídeo entomotóxico.



Reivindicação

1- PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO ENTOMOTÓXICO DA CANATOXINA, caracterizado por ser obtido por hidrólise enzimática controlada da proteína, por catepsinas (B+D) isoladas de larvas do bruquídeo *Callosobruchus maculatus*, sendo que para tanto, a canatoxina é preparada em tampão volátil de pH 5,6, sendo incubada por 18 horas a 37°C com um preparado obtido de larvas de 21 dias de *C.maculatus*, na razão de 0,5 mg azocaseinolíticas/micrograma de toxina, onde a mistura de fragmentos resultantes é fracionada por gel-filtração em coluna de Sephacryl S-100 e por cromatografia de fase reserva (FPLC, coluna PepRPC).



Resumo

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO ENTOMOTÓXICO DA CANATOXINA,
(comercialmente designado por pepcanatox), obtido por hidrólise enzimática controlada da proteína, por catepsinas (B+D) isoladas de larvas do bruquídeo *Callosobruchus maculatus*.