

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 598 491**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2010 PCT/US2010/060819**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2011 WO11084622**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2010 E 10842614 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2513314**

54 Título: **Uso combinado de proteínas cry1ca y cry1ab para la gestión de la resistencia a insectos**

30 Prioridad:

16.12.2009 US 284292 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

27.01.2017

73 Titular/es:

**DOW AGROSCIENCES LLC (100.0%)
9330 Zionsville Road
Indianapolis, IN 46268, US**

72 Inventor/es:

**MEADE, THOMAS;
NARVA, KENNETH;
STORER, NICHOLAS, P.;
SHEETS, JOEL, J.;
WOOSLEY, AARON, T. y
BURTON, STEPHANIE, L.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 598 491 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso combinado de proteínas cry1ca y cry1ab para la gestión de la resistencia a insectos

Antecedentes de la invención

5 Los seres humanos cultivan maíz para aplicaciones alimentarias y energéticas. Los seres humanos cultivan también muchas otras cosechas, incluyendo judías de soja y algodón. Los insectos se comen y dañan las plantas y socavan así estos esfuerzos humanos. Se gastan miles de millones de dólares cada año en controlar las plagas de insectos y se pierden miles de millones adicionales por los daños que ocasionan. Los insecticidas químicos orgánicos sintéticos han sido las herramientas principales usadas para controlar las plagas de insectos, pero los insecticidas biológicos, tales como las proteínas insecticidas derivadas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), han desempeñado un papel importante en algunas zonas. La capacidad de producir plantas resistentes a insectos mediante transformación con genes de la proteína insecticida de *Bt* ha revolucionado la agricultura moderna y ha elevado la importancia y valor de las proteínas insecticidas y sus genes.

10 Se han usado varias proteínas de *Bt* para crear las plantas transgénicas resistentes a insectos que se han registrado y comercializado exitosamente hasta la fecha. Estas incluyen Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa y Cry3Bb en maíz, Cry1Ac y Cry2Ab en algodón y Cry3A en patata.

15 Los productos comerciales que expresan estas proteínas expresan una sola proteína excepto en casos en que se desee un espectro insecticida combinado de 2 proteínas (p.ej., Cry1Ab y Cry3Bb en maíz combinadas para proporcionar resistencia a plagas de lepidópteros y gusano de las raíces, respectivamente) o cuando la acción independiente de las proteínas las hace útiles como herramienta para retardar el desarrollo de resistencia en poblaciones de insectos sensibles (p.ej., Cry1Ac y Cry2Ab en algodón combinadas para proporcionar gestión de la resistencia para gusano cogollero del tabaco).

20 Es decir, algunas de las cualidades de las plantas transgénicas resistentes a insectos que han conducido a una rápida y amplia adopción de esta tecnología dan lugar también a la preocupación de que las poblaciones de plagas desarrollen resistencia a las proteínas insecticidas producidas por estas plantas. Se han sugerido varias estrategias para conservar la utilidad de los rasgos de resistencia a insectos basados en *Bt* que incluyen utilizar proteínas a dosis alta en combinación con un refugio y en alternancia con, o coutilización de, diferentes toxinas (McGaughey *et al.* (1998), "B.t. Resistance Management," Nature Biotechnol. 16: 144-146).

25 Las proteínas seleccionadas para uso en un apilamiento de gestión de resistencia a insectos (IRM) tienen que ejercer su efecto insecticida independientemente, de modo que la resistencia desarrollada a una proteína no confiera resistencia a la segunda proteína (concretamente, no haya resistencia cruzada a las proteínas). Por ejemplo, si una población de plagas seleccionadas por resistencia a la "proteína A" es insensible a la "proteína B", se concluiría que no hay sensibilidad cruzada y que una combinación de proteína A y proteína B sería eficaz en el retardo de la resistencia a proteína A sola.

30 En ausencia de poblaciones de insectos resistentes, pueden hacerse valoraciones basándose en otras características que se suponen relacionadas con el mecanismo de acción y el potencial de resistencia cruzada. Se ha sugerido la utilidad de la unión mediada por receptor en la identificación de proteínas insecticidas que es probable que no exhiban resistencia cruzada (van Mellaert *et al.* 1999). El predictor clave de la falta de resistencia cruzada inherente en este enfoque es que las proteínas insecticidas no compitan por los receptores en una especie de insecto sensible.

35 En el caso de que dos toxinas *Cry* de *B.* compitan por el mismo receptor, entonces si ese receptor muta en ese insecto de modo que una de las toxinas no se una ya al receptor, y por tanto no sea ya insecticida contra el insecto, podría ser también el caso de que el insecto fuera resistente a la segunda toxina (que se une competitivamente al mismo receptor). Sin embargo, si dos toxinas se unen a receptores diferentes, esto podría ser una indicación de que el insecto no sería simultáneamente resistente a estas dos toxinas.

40 Cry1Ab es una proteína insecticida actualmente usada en maíz transgénico para proteger plantas de una variedad de plagas de insectos. Es una plaga clave del maíz para la que Cry1Ab proporciona protección el barrenador europeo del maíz.

45 Se enumeran toxinas *Cry* adicionales en el sitio web del comité de nomenclatura oficial de *B.t.* (Crickmore *et al.*; lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/). Véase el Apéndice A adjunto. Hay actualmente casi 60 grupos principales de toxinas "Cry" (Cry1-Cry59), con toxinas Cyt y toxinas VIP adicionales y similares. Muchos de cada grupo numérico tienen subgrupos en mayúscula, y los subgrupos en mayúscula tienen subsubgrupos en minúscula. (Cry1 tiene A-L, y Cry1A tiene a-i, por ejemplo).

Breve compendio de la invención

55 La invención en cuestión se refiere en parte al sorprendente descubrimiento de que Cry1Ca es muy activa contra el barrenador de caña de azúcar, incluyendo una población de barrenador de caña de azúcar que es resistente a

Cry1Ab. Como un especialista en la técnica reconocerá con el beneficio de esta divulgación, las plantas productoras de Cry1Ca y Cry1Ab (incluyendo las porciones insecticidas de las mismas) serán útiles en el retardo o la prevención del desarrollo de resistencia a cualquiera de estas proteínas insecticidas solas. Un gen cry1Fa, por ejemplo, podría también apilarse con estos dos genes/proteínas de par de bases.

- 5 La invención en cuestión se refiere también al descubrimiento de que Cry1Ca y Cry1Ab no compiten entre sí por la unión a receptores intestinales del cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*; FAW).

Breve descripción de las figuras

Figura 1 – Competición por la unión a BBMV de *Spodoptera frugiperda* por el núcleo de toxina Cry1Ab, el núcleo de toxina Cry1Ca y la proteína de núcleo de toxina Cry1Ca marcada con 125I.

- 10 **Figura 2** – Competición por la unión a BBMV de *Spodoptera frugiperda* por el núcleo de toxina Cry1Ca, el núcleo de toxina Cry1Ab y la proteína de núcleo de toxina Cry1Ab marcada con 125I.

Breve descripción de la secuencia

SEQ ID NO:1 – proteína quimérica de núcleo de Cry1Ca/protoxina de Cry1Ab de 1164 aa (DIG-152)

SEQ ID NO:2 – un núcleo de toxina Cry1Ca

- 15 **SEQ ID NO:3** – un núcleo de toxina Cry1Ab

Descripción detallada de la invención

- La invención en cuestión se refiere en parte al sorprendente descubrimiento de que Cry1Ca es muy activa contra una población de barrenador de caña de azúcar (SCB; *Diatraea saccharalis*) que es resistente a Cry1Ab. Por consiguiente, la invención en cuestión se refiere en parte al sorprendente descubrimiento de que puede usarse Cry1Ca en combinación o “apilada” con Cry1Ab para combatir el desarrollo de resistencia a cualquiera de estas proteínas insecticidas solas. Dicho de otra manera, la invención en cuestión se relaciona en parte con el sorprendente descubrimiento de que una población de barrenador de caña de azúcar seleccionada por resistencia a Cry1Ab no es resistente a Cry1Ca; los barrenadores de la caña de azúcar que son resistentes a la toxina Cry1Ab son sensibles (concretamente, no son resistentes cruzados) a Cry1Ca. Por tanto, la invención en cuestión incluye el uso de la toxina Cry1Ca para controlar poblaciones de barrenador de caña de azúcar que sean resistentes a Cry1Ab.
- 20
- 25

Como un especialista en la materia reconocerá con el beneficio de esta divulgación, las plantas que expresen Cry1Ca y Cry1Ab (incluyendo las porciones insecticidas de las mismas) serán útiles en el retardo o prevención del desarrollo de resistencia a cualquiera de estas proteínas insecticidas solas.

- 30 La invención en cuestión incluye el uso de Cry1Ca para proteger caña de azúcar y otras especies de plantas económicamente importantes del daño y pérdida de rendimiento causados por el barrenador de caña de azúcar o poblaciones de barrenador de la caña de azúcar que hayan desarrollado resistencia a Cry1Ab. El barrenador de caña de azúcar puede ser también una plaga del maíz. Esto es particularmente cierto en algunos países de América central y del sur tales como Brasil y Argentina. Por tanto, el maíz, por ejemplo, puede protegerse también según la invención en cuestión.
- 35

La invención en cuestión enseña por tanto un apilamiento de gestión de resistencia a insectos (IRM) para prevenir o mitigar el desarrollo de resistencia a Cry1Ab y/o Cry1Ca por el barrenador de caña de azúcar.

- Además, los estudios de unión a receptor que usan Cry1Ca radiomarcada y tejidos del insecto *Spodoptera frugiperda*, cogollero del maíz (FAW), muestran que Cry1Ab no compite por el sitio de unión de alta afinidad al que se une Cry1Ca. Estos resultados indican que la combinación de Cry1Ab y Cry1Ca puede usarse como un medio eficaz para mitigar el desarrollo de resistencia a Cry1Ab y/o Cry1Ca en poblaciones de insectos (tales como FAW y SCB) para plantas (tales como maíz y caña de azúcar) productoras de ambas proteínas. Aunque los estudios de superposición de toxinas demostraron que la proteína Cry1Ca se unía a dos proteínas en BBMV de *S. frugiperda*, una de 40 kDa y otra de 44 kDa, mientras que la proteína Cry1Ab se unía a una sola proteína de 150 kDa (Aranda *et al.*, 1996), eso no se relacionaba con estudios de unión no competitiva.
- 40
- 45

Por tanto, la invención en cuestión incluye también la combinación de Cry1Ca y Cry1Ab como apilamiento de IRM para mitigar el desarrollo de resistencia a cualquier proteína por cogollero del maíz y/o barrenador de caña de azúcar, o poblaciones de barrenador de caña de azúcar que han desarrollado resistencia a Cry1Ab.

- La presente invención proporciona composiciones para controlar plagas de lepidópteros que comprenden células que expresan una proteína que contiene un núcleo de toxina Cry1Ca y una proteína que contiene un núcleo de toxina Cry1Ab;
- 50

un hospedador transformado para expresar tanto una proteína que contiene un núcleo de toxina Cry1Ab como una

proteína que contiene un núcleo de toxina Cry1C, en el que dicho hospedador es un microorganismo o célula vegetal (el o los polinucleótidos en cuestión están generalmente en un constructo genético bajo el control de (o ligado operativamente a/que comprende) un promotor no de *Bacillus thuringiensis*; los polinucleótidos en cuestión pueden comprender el uso de codón para una expresión potenciada en una planta);

- 5 un método de control de plagas de lepidópteros que comprende poner en contacto dichas plagas o el ambiente de dichas plagas con una cantidad eficaz de una composición que produce una proteína que contiene un núcleo de toxina Cry1Ab y una célula que expresa una proteína que contiene un núcleo de toxina Cry1C;

una planta (tal como una planta de maíz, o judías de soja o algodón o caña de azúcar, por ejemplo) que comprende ADN que codifica una proteína que contiene un núcleo de toxina Cry1Ca y ADN que codifica una proteína que contiene un núcleo de toxina Cry1Ab, y semillas de dicha planta;

una planta, tal como una planta de maíz, o judías de soja, o algodón o caña de azúcar, por ejemplo), en la que se ha introducido ADN que codifica una proteína que contiene un núcleo de toxina Cry1Ca y ADN que codifica una proteína que contiene un núcleo de toxina Cry1Ab en dicha planta de maíz, y semillas de dicha planta.

15 Se ha demostrado, por ejemplo, que Cry1Ca (proteína de *Pseudomonas fluorescens* recombinante cepa MR1206/DC639; plásmido pMYC2547) es muy eficaz en el control de poblaciones de barrenador de caña de azúcar (SCB; *Diatraea saccharalis*) en bioensayos de dieta artificial, que se han seleccionado por resistencia a Cry1Ab. Esto indica que Cry1Ca es útil en el control de poblaciones de SCB que han desarrollado resistencia a Cry1Ab o en la mitigación del desarrollo de resistencia a Cry1Ab en poblaciones de SCB.

20 Basándose en parte en los datos descritos en la presente memoria, la coexpresión de Cry1Ca y Cry1Ab puede producir una alta dosis de apilamientos de IRM para controlar SCB. Pueden añadirse otras proteínas a esta combinación para ampliar espectro. Por ejemplo, en maíz, la adición de Cry1Fa crearía un apilamiento de IRM para el barrenador europeo del maíz (ECB), *Ostrinia nubilalis* (Hübner), mientras que añade aún otro MOA para el control de SCB.

25 Para una revisión de Cry1C como bioinsecticida potencial de plantas véase (Avisar *et al.* 2009). Avisar D, Eilenberg H, Keller M, Reznik N, Segal M, Sneh B, Zilberstein A (2009) "The Bacillus thuringiensis delta-endotoxin Cry1C as a potential bioinsecticide in plants". *Plant Science* 176: 315-324.

30 Receptores de insecto. Como se describe en los Ejemplos, estudios de unión competitiva de receptor que usan proteína de núcleo de toxina Cry1Ca radiomarcada muestran que la proteína de núcleo de toxina Cry1Ab no compite por el sitio de alta afinidad presente en tejidos del insecto FAW al que se une Cry1Ca. Estos resultados indican que la combinación de proteínas Cry1Ab y Cry1Ca sería un medio eficaz para mitigar el desarrollo de resistencia a Cry1Ab en poblaciones de FAW (e igualmente, el desarrollo de resistencia a Cry1Ca), y aumentarían probablemente el nivel de resistencia a esta plaga en plantas de maíz que expresen ambas proteínas.

35 Estos datos sugieren también que Cry1Ca sería eficaz en el control de poblaciones de SCB que hayan desarrollado resistencia a Cry1Ab. Una opción de utilización sería usar estas proteínas Cry en geografías donde Cry1Ab se haya vuelto ineficaz en el control de SCB debido al desarrollo de resistencia. Otra opción de utilización sería usar Cry1Ca en combinación con Cry1Ab para mitigar el desarrollo de resistencia a Cry1Ab de SCB.

40 Las combinaciones de las toxinas descritas en la invención pueden usarse para controlar plagas de lepidópteros. Los lepidópteros adultos, concretamente mariposas y polillas, se alimentan principalmente de néctar de flores. Las larvas, concretamente orugas, se alimentan casi todas de plantas, y muchas son plagas graves. Las orugas se alimentan de o dentro del follaje o en las raíces o tallos de una planta, privando a la planta de nutrientes y destruyendo a menudo la estructura de soporte físico de la planta. Adicionalmente, las orugas se alimentan de fruta, tejido y granos y harinas almacenados, estropeando estos productos para la venta o disminuyendo su valor en gran medida. Como se usa en la presente memoria, la referencia a plagas de lepidóptero hace referencia a diversas etapas vitales de la plaga, incluyendo etapas larvales.

45 Las toxinas quiméricas de la invención en cuestión comprenden una porción de núcleo de toxina N-terminal completo de una toxina de B.t. y, en algún punto después del final de la porción de toxina, la proteína tiene una transición a una secuencia de protoxina heteróloga. Se hace referencia a la porción de toxina N-terminal de una toxina de B.t. en la presente memoria como el "núcleo" de toxina. La transición al segmento de protoxina heteróloga puede aparecer aproximadamente en la unión toxina/protoxina o, como alternativa, puede retenerse una porción de la protoxina nativa (que se extiende después de la porción de toxina), con la transición a la protoxina heteróloga apareciendo más adelante.

50 Como ejemplo, una toxina quimérica de la invención en cuestión tiene la porción de núcleo de toxina completo de Cry1Ab (aminoácidos 1 a 601) y una protoxina heteróloga (aminoácidos 602 al extremo C). En una realización preferida, la porción de una toxina quimérica que comprende la protoxina deriva de una toxina proteína Cry1Ab. Como segundo ejemplo, una segunda toxina quimérica de la invención en cuestión, como se divulga en la **SEQ ID NO:1** (DIG-152), tiene la porción de núcleo de toxina completo de Cry1Ca (aminoácidos 1 a 619) y una protoxina heteróloga (aminoácidos 620 al extremo C). En una realización preferida, la porción de toxina quimérica que

comprende la protoxina deriva de una toxina proteina Cry1Ab.

Un especialista en esta materia apreciará que las toxinas de B.t., incluso dentro de una cierta clase tal como Cry1Ca, variarán en cierta medida en longitud y la localización precisa de la transición de porción de toxina a porción de protoxina. Típicamente, las toxinas cry1Ca son de aproximadamente 1150 a aproximadamente 1200 aminoácidos de longitud. La transición de porción de toxina a porción de protoxina aparecerá típicamente a entre aproximadamente 50 % y aproximadamente 60 % de la toxina completa. La toxina quimérica de la invención en cuestión incluirá la expansión completa de esta porción de núcleo de toxina N-terminal. Por tanto, la toxina quimérica comprenderá al menos aproximadamente un 50 % de la toxina de B.t. cry1Ca o Cry1Ab completa. Esta será típicamente de al menos aproximadamente 590 aminoácidos. Con respecto a la porción de protoxina, la expansión completa de la porción de protoxina de Cry1A(b) se extiende desde el final de la porción de toxina al extremo C de la molécula. Son los últimos aproximadamente 100 a 150 aminoácidos de esta porción los que son más críticos para incluir en la toxina quimérica de la invención en cuestión.

Genes y toxinas. Los genes y toxinas útiles según la invención en cuestión incluyen no solo las secuencias completas divulgadas, sino también fragmentos de estas secuencias, variantes, mutantes y proteínas de fusión que retienen la actividad plaguicida característica de las toxinas específicamente ejemplificadas en la presente memoria. Como se usa en la presente memoria, los términos "variantes" o "variaciones" de genes hacen referencia a secuencias nucleotídicas que codifican las mismas toxinas o que codifican toxinas equivalentes que tienen actividad plaguicida. Como se usa en la presente memoria, el término "toxinas equivalentes" hace referencia a toxinas que tienen la misma o esencialmente la misma actividad biológica contra las plagas diana que las toxinas reivindicadas.

Como se usa en la presente memoria, los límites representan aproximadamente un 95 % (Cry1Ab y 1Ca), un 78 % (Cry1A y Cry1C) y un 45 % (Cry1) de identidad de secuencia según la "Revision of the Nomenclature for the Bacillus thuringiensis Pesticidal Crystal Proteins," N. Crickmore, D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum y D.H. Dean. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (1998) Vol 62: 807-813. Estos cortes pueden aplicarse también a los núcleos de toxina solos (para toxinas Cry1Ab y Cry1C). Los números de GENBANK enumerados en el Apéndice A adjunto pueden usarse también para obtener secuencias de cualquiera de los genes y proteínas divulgados o mencionados en la presente memoria.

Debería ser evidente para un especialista en esta materia que los genes que codifican toxinas activas pueden identificarse y obtenerse mediante varios medios. Los genes específicos o porciones génicas ejemplificados en la presente memoria pueden obtenerse a partir de los aislamientos depositados en un depósito de cultivos como se describe anteriormente. Estos genes, o porciones o variantes de los mismos, pueden construirse también sintéticamente, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador génico. Pueden construirse fácilmente variaciones de genes usando técnicas estándares para elaborar mutaciones puntuales. También pueden elaborarse fragmentos de estos genes usando exonucleasas o endonucleasas comercialmente disponibles según procedimientos estándares. Por ejemplo, pueden usarse enzimas tales como Bal31 o mutagénesis dirigida a sitio para cortar sistemáticamente nucleótidos de los extremos de estos genes. También pueden obtenerse genes que codifican fragmentos activos usando una variedad de enzimas de restricción. Las proteasas pueden usarse para obtener directamente fragmentos activos de estas toxinas.

Los fragmentos y equivalentes que retienen la actividad plaguicida de las toxinas ejemplificadas estarían dentro del alcance de la invención en cuestión. También, debido a la redundancia del código genético, una variedad de secuencias de ADN diferentes puede codificar las secuencias aminoácidas divulgadas en la presente memoria. Está dentro de las habilidades de un persona entrenada en la materia crear estas secuencias de ADN alternativas que codifican las mismas, o esencialmente las mismas, toxinas. Estas secuencias de ADN variantes están dentro del alcance de la invención en cuestión. Como se usa en la presente memoria, la referencia a "esencialmente la misma" secuencia hace referencia a secuencias que tienen sustituciones, deleciones, adiciones o inserciones aminoácidas que no afectan materialmente a la actividad plaguicida. Los fragmentos que retienen actividad plaguicida están también incluidos en esta definición.

Es un método adicional para identificar las toxinas codificadas por genes y porciones de genes útiles según la invención en cuestión mediante el uso de sondas oligonucleotídicas. Estas sondas son secuencias nucleotídicas detectables. Estas secuencias pueden ser detectables en virtud de un marcador apropiado o pueden hacerse inherentemente fluorescentes como se describe en la solicitud internacional nº WO93/16094. Como es bien conocido en la materia, si la molécula de sonda y la muestra de ácido nucleico hibridan formando un enlace fuerte entre las dos moléculas, puede suponerse razonablemente que sonda y muestra tienen una homología sustancial. Preferiblemente, la hibridación se realiza en condiciones rigurosas mediante técnicas bien conocidas en la materia, como se describen por ejemplo en Keller, G. H., M. M. Manak (1987) "DNA Probes", Stockton Press, Nueva York, N.Y., pág. 169-170. Algunos ejemplos de combinaciones de concentraciones salinas y temperatura son como sigue: (en orden de rigor creciente): 2X SSPE o SSC a temperatura ambiente; 1X SSPE o SSC a 42 °C; 0,1X SSPE o SSC a 42 °C; 0,1X SSPE o SSC a 65 °C. La detección de la sonda proporciona un medio para determinar de manera conocida si ha aparecido hibridación. Dicho análisis de sonda proporciona un método rápido para identificar genes que codifican toxinas de la invención en cuestión. Los segmentos nucleotídicos que se usan como sondas según la invención pueden sintetizarse usando un sintetizador de ADN y procedimientos estándares. Estas secuencias nucleotídicas pueden usarse también como cebadores de PCR para amplificar genes de la invención en cuestión.

Ciertas toxinas de la invención en cuestión se han ejemplificado específicamente en la presente memoria. Puesto que estas toxinas son meramente ejemplares de las toxinas de la invención en cuestión, debería ser fácilmente evidente que la invención en cuestión comprende toxinas variantes o equivalentes (y secuencias nucleotídicas que codifican toxinas equivalentes) que tienen la misma o similar actividad plaguicida que la toxina ejemplificada. Las toxinas equivalentes tendrán homología aminoacídica con una toxina ejemplificada. Esta homología aminoacídica será típicamente mayor del 75 %, preferiblemente mayor del 90 %, y lo más preferiblemente mayor del 95 %. La homología aminoacídica será máxima en regiones críticas de la toxina que dan cuenta de la actividad biológica o están implicadas en la determinación de la configuración tridimensional que es responsable en última instancia de la actividad biológica. A este respecto, ciertas sustituciones aminoacídicas son aceptables y pueden esperarse si estas sustituciones están en regiones que no son críticas para la actividad o son sustituciones aminoacídicas conservativas que no afectan la configuración tridimensional de la molécula. Por ejemplo, los aminoácidos pueden disponerse en las siguientes clases: no polares, polares no cargados, básicos y ácidos. Las sustituciones aminoacídicas conservativas mediante las que se reemplaza un aminoácido de una clase por otro aminoácido del mismo tipo entran dentro del alcance de la invención en cuestión, a condición de que la sustitución no altere materialmente la actividad biológica del compuesto. La Tabla 1 proporciona un listado de ejemplos de aminoácidos pertenecientes a cada clase.

Tabla 1

Clase de aminoácido	Ejemplos de aminoácidos
No polares	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp
Polares no cargados	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln
Ácidos	Asp, Glu
Básicos	Lys, Arg, His

En algunos casos, pueden hacerse también sustituciones no conservativas. El factor crítico es que estas sustituciones no deben restar significativamente actividad biológica de la toxina.

Hospedadores recombinantes. Los genes que codifican las toxinas de la invención en cuestión pueden introducirse en una amplia variedad de hospedadores microbianos o vegetales. La expresión del gen de toxina da como resultado, directa o indirectamente, la producción intracelular y el mantenimiento del plaguicida. Pueden usarse la transferencia conjugada y la transferencia recombinante para crear una cepa de B.t. que exprese ambas toxinas de la invención en cuestión. Pueden transformarse también otros organismos hospedadores con uno o ambos de los genes de toxina y usarse entonces para lograr un efecto sinérgico. Con hospedadores microbianos adecuados, p.ej. *Pseudomonas*, los microbios pueden aplicarse al sitio de la plaga, donde proliferarán y se ingerirán. El resultado es el control de la plaga. Como alternativa, el microbio que alberga el gen de toxina puede tratarse en condiciones que prolonguen la actividad de la toxina y establezcan la célula. La célula tratada, que retiene la actividad tóxica, puede aplicarse entonces al ambiente de la plaga diana.

Cuando se introduce el gen de la toxina de B.t. a través de un vector adecuado en un hospedador microbiano, y se aplica dicho hospedador al ambiente en estado vivo, es esencial usar ciertos microbios hospedadores. Se seleccionan microorganismos hospedadores que son conocidos por ocupar la "fitosfera" (filoplano, filosfera, rizosfera y/o rizoplano) de una o más cosechas de interés. Estos microorganismos se seleccionan para ser capaces de competir exitosamente en el ambiente particular (cosecha y otros hábitat de insectos) con los microorganismos de tipo silvestre, proporcionar un mantenimiento estable y expresión del gen que expresa el plaguicida polipeptídico y, deseablemente, proporcionar una protección mejorada al plaguicida ante la degradación e inactivación ambientales.

Son conocidos un gran número de microorganismos que habitan el filoplano (la superficie de las hojas de plantas) y/o la rizosfera (el suelo que rodea las raíces de plantas) de una amplia variedad de cosechas importantes. Estos microorganismos incluyen bacterias, algas y hongos. Son de particular interés microorganismos tales como bacterias, p.ej., los géneros *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylophilus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc* y *Alcaligenes*; hongos, particularmente levadura, p.ej. los géneros *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* y *Aureobasidium*. Son de particular interés especies bacterianas de fitosfera como *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium melioli*, *Alcaligenes entrophus* y *Azotobacter vinlandii*; y especies de levadura de fitosfera tales como *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. marina*, *R. aurantiaca*, *Cryptococcus albidus*, *C. diffluens*, *C. laurentii*, *Saccharomyces rosei*, *S. pretoriensis*, *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces roseus*, *S. odoratus*, *Kluyveromyces veronae* y *Aureobasidium pullulans*.

Son de particular interés los microorganismos pigmentados.

Están disponibles una amplia variedad de modos para introducir un gen de B.t. que codifica una toxina en un microorganismo hospedador en condiciones que permitan el mantenimiento estable y la expresión del gen. Estos métodos son bien conocidos por los especialistas en la materia y se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 5.135.867, que se incorpora a la presente memoria como referencia.

Tratamiento de células. Los *Bacillus thuringiensis* o células recombinantes que expresan las toxinas de B.t. pueden tratarse para prolongar la actividad de la toxina y estabilizar la célula. La microcápsula de plaguicida que se forma comprende la toxina o toxinas de B.t. en una estructura celular que se ha estabilizado y protegerá la toxina cuando se aplique la microcápsula al ambiente de la plaga diana. Las células hospedadoras adecuadas pueden incluir procariontas o eucariotas, estando limitadas normalmente a aquellas células que no producen sustancias tóxicas para organismos superiores, tales como mamíferos. Sin embargo, podrían usarse organismos que producen sustancias tóxicas para organismos superiores cuando las sustancias tóxicas sean inestables o el nivel de aplicación sea suficientemente bajo como para evitar la posibilidad de toxicidad para un hospedador mamífero. Como hospedadores, serán de particular interés los procariontas y los eucariotas inferiores, tales como hongos.

La célula estará habitualmente intacta y estará sustancialmente en forma proliferativa cuando se trate, en lugar de en forma de espora, aunque pueden emplearse esporas en algunos casos.

El tratamiento de las células microbianas, p.ej. un microbio que contiene el gen o genes de la toxina de B.t., puede ser por medios químicos o físicos o por una combinación de medios químicos y/o físicos, a condición de que la técnica no afecte negativamente las propiedades de la toxina, ni disminuya la capacidad celular de protección de la toxina. Los ejemplos de reactivos químicos son agentes halogenantes, particularmente halógenos de nº atómico 17-80. Más particularmente, puede usarse yodo en condiciones suaves y durante suficiente tiempo para conseguir los resultados deseados. Otras técnicas adecuadas incluyen el tratamiento con aldehídos tales como glutaraldehído, antiinfecciosos tales como cloruro de zefirán y cloruro de cetilpiridinio; alcoholes tales como isopropílico y etanol; diversos fijadores histológicos tales como yodo de Lugol, fijador de Bouin, diversos ácidos y fijador de Helly (véase: Humason, Gretchen L., "Animal Tissue Techniques", W. H. Freeman and Company, 1967); o una combinación de agentes físicos (calor) y químicos que conserve y prolongue la actividad de la toxina producida en la célula cuando se administra la célula al ambiente del hospedador. Los ejemplos de medios físicos son radiación de longitud de onda corta tal como radiación gamma y radiación X, congelación, irradiación UV, liofilización y similares. Se divulgan métodos para el tratamiento de células microbianas en las patentes de EE.UU. nº 4.695.455 y 4.695.462, que se incorporan a la presente memoria como referencia.

Las células tendrán generalmente una estabilidad estructural potenciada que potenciará la resistencia a las condiciones ambientales. Cuando el plaguicida está en una proforma, el método de tratamiento celular debería seleccionarse para no inhibir el procesamiento de la proforma hasta la forma madura del plaguicida por el patógeno plaga diana. Por ejemplo, el formaldehído reticulará proteínas y podría inhibir el procesamiento de la proforma de un plaguicida polipeptídico. El método de tratamiento debería retener al menos una porción sustancial de la biodisponibilidad o bioactividad de la toxina.

Las características de interés particular en la selección de una célula hospedadora con fines de producción incluyen facilidad de introducción del gen o genes de B.t. en el hospedador, disponibilidad de sistemas de expresión, eficacia de expresión, estabilidad del plaguicida en el hospedador y la presencia de capacidades genéticas auxiliares. Las características de interés para uso como microcápsula plaguicida incluyen cualidades protectoras para el plaguicida, tales como paredes celulares gruesas, pigmentación y empaquetamiento intracelular o formación de cuerpos de inclusión; supervivencia en ambientes acuosos; falta de toxicidad para mamíferos; atractivo para ingestión por las plagas; facilidad de destrucción y fijación sin daño para la toxina y similares. Otras consideraciones incluyen facilidad de formulación y manejo, economía, estabilidad al almacenamiento y similares.

Crecimiento de células. El hospedador celular que contiene el gen o genes insecticidas de B.t. puede cultivarse en cualquier medio nutriente conveniente donde el constructo de ADN proporcione una ventaja selectiva, proporcionando un medio selectivo de modo que sustancialmente todas o todas las células retengan el gen de B.t. Estas células pueden recolectarse entonces de acuerdo con modos convencionales. Como alternativa, las células pueden tratarse antes de recolectar.

Las células de B.t. productoras de toxinas de la invención pueden cultivarse usando medios y técnicas de fermentación estándares en la materia. Tras la terminación del ciclo de fermentación, pueden recolectarse las bacterias separando en primer lugar las esporas y cristales de B.t. del caldo de fermentación por medios bien conocidos en la materia. Las esporas y cristales de B.t. recuperados pueden formularse en un polvo humectable, concentrado líquido, gránulos u otras formulaciones mediante la adición de tensioactivos, dispersantes, portadores inertes y otros componentes para facilitar el manejo y aplicación para plagas diana particulares. Estas formulaciones y procedimientos de aplicación son todos bien conocidos en la materia.

Formulaciones. Los gránulos de cebo formulados que contienen un atractor y esporas, cristales y toxinas de los aislamientos de B.t., o microbios recombinantes que comprenden los genes obtenibles a partir de los aislamientos

de B.t. divulgados en la presente memoria, pueden aplicarse al suelo. El producto formulado puede aplicarse también como recubrimiento de semilla o tratamiento de raíz o tratamiento de planta total en etapas posteriores del ciclo de la cosecha. Los tratamientos de planta y suelo de células de B.t. pueden emplearse como polvos humectables, gránulos o polvos finos, mezclando con diversos materiales inertes tales como minerales inorgánicos (filosilicatos, carbonatos, sulfatos, fosfatos y similares) o materiales botánicos (mazorcas de maíz en polvo, cáscaras de arroz, cáscaras de nuez y similares). Las formulaciones pueden incluir coadyuvantes de extensión-adhesión, agentes estabilizantes, otros aditivos plaguicidas o tensioactivos. Las formulaciones líquidas pueden ser de base acuosa o no acuosa y emplearse como espumas, geles, suspensiones, concentrados emulsionables o similares. Los ingredientes pueden incluir agentes reológicos, tensioactivos, emulsionantes, dispersantes o polímeros.

Como se apreciaría por un especialista en la materia, la concentración de plaguicida variará dependiendo de la naturaleza de la formulación particular, particularmente si es un concentrado o para usar directamente. El plaguicida estará presente en al menos un 1 % en peso y puede ser de 100 % en peso. Las formulaciones secas tendrán aproximadamente 1-95 % en peso del plaguicida, mientras que las formulaciones líquidas serán de aproximadamente 1-60 % en peso de los sólidos en la fase líquida. Las formulaciones tendrán generalmente de aproximadamente 10^2 a aproximadamente 10^4 células/mg. Estas formulaciones se administrarán de aproximadamente 50 mg (líquido o seco) a 1 kg o más por hectárea.

Las formulaciones pueden aplicarse al ambiente de la plaga de lepidóptero, p.ej. follaje o suelo, por pulverización, espolvoreado, rociado o similar.

Transformación de plantas. Es un hospedador recombinante preferido para la producción de las proteínas insecticidas de la invención en cuestión una planta transformada. Los genes que codifican proteínas toxinas de *Bt*, como se divulgan en la presente memoria, pueden insertarse en células vegetales usando una variedad de técnicas que son bien conocidas en la materia. Por ejemplo, están disponibles un gran número de vectores de clonación que comprenden un sistema de replicación en *Escherichia coli* y un marcador que permite la selección de las células transformadas para preparación para la inserción de genes extraños en plantas superiores. Los vectores comprenden por ejemplo, pBR322, la serie pUC, la serie M13mp y pACYC184, entre otros. Por consiguiente, el fragmento de ADN que tiene la secuencia que codifica la proteína toxina de *Bt* puede insertarse en el vector en un sitio de restricción adecuado. El plásmido resultante se usa para transformación en *E. coli*. Las células de *E. coli* se cultivan en un medio nutriente adecuado, se recolectan entonces y se lisan. Se recupera el plásmido. Se llevan generalmente a cabo análisis de secuencia, análisis de restricción, electroforesis y otros métodos bioquímicos o de biología molecular como métodos de análisis. Después de cada manipulación, la secuencia de ADN usada puede escindirse y unirse a la siguiente secuencia de ADN. Puede clonarse cada secuencia de plásmido en el mismo u otros plásmidos. Dependiendo del método de inserción de genes deseados en la planta, pueden ser necesarias otras secuencias de ADN. Si se usa, por ejemplo, el plásmido Ti o Ri para la transformación de la célula vegetal, entonces tiene que unirse al menos el borde derecho, pero a menudo el borde derecho e izquierdo, del ADN-T de plásmido Ti o Ri como región flanqueante de los genes para insertar. El uso de ADN-T para la transformación de células vegetales se ha investigado extensamente y se ha descrito suficientemente en el documento EP 120.516, Lee y Gelvin (2008), Hoekema (1985), Fraley *et al.*, (1986) y An *et al.*, (1985), y está bien establecido en la materia.

Una vez se ha integrado el ADN insertado en el genoma vegetal, es relativamente estable. El vector de transformación contiene normalmente un marcador selectivo que confiere a las células vegetales transformadas resistencia a un biocida o un antibiótico, tales como bialafós, kanamicina, G418, bleomicina o higromicina, entre otros. El marcador empleado individualmente debería permitir por consiguiente la selección de células transformadas en lugar de células que no contienen el ADN insertado.

Está disponible un gran número de técnicas para insertar ADN en una célula hospedadora vegetal. Esas técnicas incluyen transformación con ADN-T usando *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* como agente de transformación, fusión, inyección, biolística (bombardeo de micropartículas) o electroporación, así como otros métodos posibles. Si se usan *Agrobacterium* para la transformación, el ADN para insertar tiene que clonarse en plásmidos especiales, a saber, cualquiera de un vector intermedio o un vector binario. Los vectores intermedios pueden integrarse en el plásmido Ti o Ri mediante recombinación homóloga debido a secuencias que son homólogas con secuencias del ADN-T. El plásmido Ti o Ri comprende también la región vir necesaria para la transferencia de ADN-T. Los vectores intermedios no pueden replicarse por sí mismos en *Agrobacterium*. El vector intermedio puede transferirse a *Agrobacterium tumefaciens* mediante un plásmido auxiliar (conjugación). Los vectores binarios pueden replicarse por sí mismos tanto en *E. coli* como en *Agrobacterium*. Comprenden un gen marcador de selección y un ligador o poliligador que están en fase con las regiones de borde derecho e izquierdo de ADN-T. Pueden transformarse directamente en *Agrobacterium* (Holsters *et al.*, 1978). La *Agrobacterium* usada como célula hospedadora ha de comprender un plásmido portador de una región vir. La región vir es necesaria para la transferencia del ADN-T a la célula vegetal. Puede contener ADN-T adicional. La bacteria así transformada se usa para la transformación de células vegetales. Pueden cultivarse ventajosamente explantes vegetales con *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* para la transferencia del ADN a la célula vegetal. Pueden regenerarse plantas enteras a partir del material vegetal infectado (por ejemplo, trozos de hoja, segmentos de tallo, raíces, pero también protoplastos o células cultivadas en suspensión) en un medio adecuado, que puede contener antibióticos o biocidas para selección. En las plantas así obtenidas puede ensayarse entonces la presencia del ADN insertado. No plantean demandas especiales los plásmidos en el caso de inyección y electroporación. Es posible

usar plásmidos ordinarios tales como, por ejemplo, derivados de pUC.

Las células transformadas crecen dentro de las plantas de la manera habitual. Pueden formar células germinales y transmitir el rasgo o rasgos transformados a plantas de progenie. Dichas plantas pueden crecer de manera normal y cruzarse con plantas que tengan los mismos factores hereditarios transformados u otros factores hereditarios. Los individuos híbridos resultantes tienen las correspondientes propiedades fenotípicas.

En una realización preferida de la invención en cuestión, se transformarán las plantas con genes en los que el uso de codón se ha optimizado para plantas. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5380831, que se incorpora por la presente como referencia. Aunque se ejemplifican en la presente memoria algunas toxinas truncadas, es bien conocido en las técnicas de *Bt* que las toxinas de tipo 130 kDa (completas) tienen una mitad N-terminal que es el núcleo de toxina y una mitad C-terminal que es la "cola" de protoxina. Por tanto, pueden usarse "colas" apropiadas con toxinas truncadas/núcleos de toxina de la invención en cuestión. Véanse, p.ej., la patente de EE.UU. n° 6218188 y la patente de EE.UU. n° 6673990. Además, son conocidos en la materia métodos para crear genes de *Bt* sintéticos para uso en plantas (Stewart y Burgin, 2007). Es un ejemplo no limitante de una planta transformada preferida una planta de maíz fértil que comprende un gen expresable en planta que codifica una proteína Cry1Fa, y que comprende además un segundo gen expresable en planta que codifica una proteína Cry1Ca.

La transferencia (o introducción) del rasgo o rasgos de Cry1Ab y Cry1C en estirpes de maíz endogámicas puede conseguirse mediante crianza de selección recurrente, por ejemplo por retrocruzamiento. En este caso, se cruza primero un progenitor recurrente deseado con un donante endogámico (el progenitor no recurrente) que porta el gen o genes apropiados para los rasgos Cry1Ab y Cry1C. Se vuelve a cruzar la progenie de este cruzamiento con el progenitor recurrente seguido de selección en la progenie resultante del rasgo o rasgos deseados para transferir desde el progenitor no recurrente. Después de tres, preferiblemente cuatro, más preferiblemente cinco o más generaciones o retrocruzamientos con el progenitor recurrente con selección del rasgo o rasgos deseados, la progenie será heterocigótica de los loci que controlan el rasgo o rasgos que se transfieren, pero será como el progenitor recurrente para la mayoría o casi todos los demás genes (véanse, por ejemplo, Poehlman & Sleper (1995) "Breeding Field Crops", 4ª Ed., 172-175; Fehr (1987) "Principles of Cultivar Development", Vol. 1: "Theory and Technique", 360-376).

Estrategias de gestión de resistencia a insectos (IRM). Roush *et al.*, por ejemplo, resume las estrategias de dos toxinas, también denominadas de "piramidación" o "apilamiento" para la gestión de cosechas transgénicas insecticidas. (The Royal Society. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. (1998) 353, 1777-1786). En su sitio web, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (epa.gov/opppbpd1/biopesticides/pips/bt_com_refuge_2006.htm) publica los siguientes requisitos para proporcionar refugios no transgénicos (concretamente, no de *B.t.*) (un bloque de cosechas sin *B.t./maíz*) para uso con cosechas transgénicas productoras de una sola proteína de Bt activa contra plagas diana.

Los requisitos estructurados específicos para productos de maíz protegidos del barrenador del maíz con Bt (Cry1Ab o Cry1F) son como siguen:

Refugios estructurados:

20 % de refugio de maíz sin Bt de lepidópteros en el cinturón del maíz

50 % de refugio sin Bt de lepidópteros en el cinturón del algodón

Bloques

1. Interno (concretamente, en el campo de Bt)

2. Externo (concretamente, campos separados por 0,8 km (0,4 km si es posible) del campo de Bt para maximizar el cruce aleatorio)

Franjas en el campo

Las franjas deben ser de al menos 4 filas de ancho (preferiblemente 6 filas) para reducir los efectos del movimiento larval

La Asociación Nacional de Productores de Maíz, en su sitio web (ncga.com/insect-resistance-management-fact-sheet-bt-corn), proporciona también una guía similar respecto a los requisitos. Por ejemplo:

Requisitos de IRM de barrenador del maíz:

- Plantar al menos un 20 % de los acres de maíz con híbridos de refugio
- En regiones productoras de algodón, el refugio debe ser de un 50 %
- Debe plantarse a 0,8 km de los híbridos de refugio

- El refugio puede plantarse como franjas en el campo de Bt; las franjas de refugio deben ser de al menos 4 filas de ancho
 - El refugio puede tratarse con plaguicidas convencionales solo si se alcanzan los umbrales económicos para el insecto diana
- 5
- No pueden usarse insecticidas pulverizables basados en Bt en el maíz de refugio
 - Debe plantarse el refugio apropiado en cada granja con maíz de Bt

10 Como se afirma por Roush *et al.* (en las páginas 1780 y 1784 columna derecha, por ejemplo), el apilamiento o piramidación de dos proteínas diferentes cada una eficaz contra las plagas diana y con poca o ninguna resistencia cruzada puede permitir el uso de un refugio menor. Roush sugiere que, para un apilamiento exitoso, un tamaño de refugio de menos de un 10% de refugio puede proporcionar una gestión de la resistencia comparable con aproximadamente un 50 % de refugio para un solo rasgo (no piramidado). Para productos de maíz de Bt piramidados actualmente disponibles, la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. requiere plantar significativamente menos (generalmente un 5 %) de refugio estructurado de maíz sin Bt que para productos de un solo rasgo (generalmente un 20 %).

15 Puede usarse cualquiera de los porcentajes anteriores (tales como aquellos de 1F/1Ab), o relaciones de refugio similares, para los apilamientos o pirámides dobles o triples en cuestión. La invención en cuestión incluye una extensión comercial, de más de 4 hectáreas por ejemplo, plantada con (o sin) dicho refugio y con plantas según la invención en cuestión.

20 Existen diversos modos de proporcionar el refugio, incluyendo diversos patrones de plantación geométrica en los campos (como se menciona anteriormente), a mezcla de semilla en bolsa, como se discute adicionalmente por Roush y, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 6.551.962.

25 Todas las patentes, solicitudes de patente, solicitudes provisionales y publicaciones a las que se hace referencia o se cita en la presente memoria se incorporan como referencia en su totalidad en la medida en que no sean inconsistentes con las enseñanzas explícitas de esta memoria descriptiva. A menos que se indique o implique específicamente, los términos "un", "una" y "el/la" significan "al menos uno" como se usa en la presente memoria.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención. Los ejemplos no deberían considerarse como limitantes.

Ejemplo 1

Diseño de toxinas quiméricas que comprenden núcleos de toxina Cry1 y protoxinas heterólogas, y actividad insecticida de la proteína DIG-152 producida en *Pseudomonas fluorescens*

30 Toxinas quiméricas. Se han reseñado anteriormente proteínas quiméricas que utilizan el dominio de núcleo de toxina de una toxina Cry fusionado con el segmento de protoxina de otra toxina Cry, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 5593881 y la patente de EE.UU. n° 5932209.

35 Las variantes de proteína quimérica Cry1Ca de esta invención incluyen toxinas quiméricas que comprenden un segmento de núcleo de toxina N-terminal derivado de una toxina insecticida Cry1Ca3 fusionado con un segmento de protoxina de delta-endotoxina heteróloga en algún punto después del final del segmento de núcleo de toxina. La transición del núcleo de toxina al segmento de protoxina heteróloga puede aparecer aproximadamente en la unión de núcleo de toxina/protoxina nativa o puede retenerse una porción de la protoxina nativa (que se extiende después del segmento de núcleo de toxina), apareciendo la transición a la protoxina heteróloga más adelante. En forma variante, los segmentos de núcleo de toxina y protoxina pueden comprender exactamente la secuencia aminoacídica de las toxinas nativas de las que derivan, o pueden incluir adiciones, deleciones o sustituciones aminoacídicas que no disminuyan, y puedan potenciar, la función biológica de los segmentos cuando se fusionan entre sí.

40 Por ejemplo, una toxina quimérica de la invención en cuestión comprende un segmento de núcleo de toxina derivado de Cry1Ca3 y una protoxina heteróloga. En una realización preferida de la invención, se fusiona el segmento de núcleo de toxina derivado de Cry1Ca3 (619 aminoácidos) con un segmento heterólogo que comprende un segmento de protoxina derivado de una delta-endotoxina Cry1Ab (545 aminoácidos). La secuencia de 1164 aminoácidos de la proteína quimérica, a la que se hace referencia en la presente memoria como DIG-152, se divulga como la **SEQ ID NO:1**. Ha de entenderse que otras fusiones quiméricas que comprenden variantes de núcleo de toxina Cry1Ca3 y protoxinas derivadas de Cry1Ab están dentro del alcance de esta invención.

50 Se demostró la actividad insecticida de lepidópteros de la proteína DIG-152 en larvas neonatas del barrenador de caña de azúcar (SCB; *Diatraea saccharalis*) y SCB resistentes a Cry1Ab (rSCB) en experimentos de dosis respuesta que utilizan procedimientos de incorporación a dieta. Se solubilizaron cuerpos de inclusión de DIG-152 oscilando suavemente a 4 °C durante 4 h en 7,5 ml de CAPS 100 mM pH 11, EDTA 1 mM, al que se habían añadido 200 µl de inhibidor de proteasa bacteriana (Sigma P4865; preparado según las instrucciones del proveedor). Después de la centrifugación para sedimentar el material insoluble, se ajustó la concentración de proteína madre a

4,0 mg/ml en CAPS 100 mM, pH 11. Para biosensayo de insectos, se prepararon concentraciones de proteína DIG-152 en el intervalo de 0,030 µg a 102 µg/g de dieta mezclando volúmenes apropiados con una dieta merídica (Bio-Serv, Frenchtown, NJ), justo antes de dispensar aproximadamente 0,7 ml de la dieta en células individuales de bandejas de 128 células (Bio-Ba-128, C-D International).

- 5 Se ensayó proteína Cry1Ab activada con tripsina (usada como control positivo para actividad insecticida) en el intervalo de 0,03125 µg a 32 µg/g de dieta (preparada mezclando polvo liofilizado con cantidades apropiadas de agua destilada antes de la preparación de la dieta).

10 Se usaron como tratamientos de control dietas preparadas con agua destilada (control de blanco para las pruebas de Cry1Ab) o solo tampón (CAPS 100 mM, pH 11, para las pruebas de DIG-152). Se liberó una larva neonata de *D. saccharalis* (<24 h después de la eclosión) en la superficie de dieta de cada célula. Después de la inoculación larval, se cubrieron las células con tapas ventiladas (C-D International) y se dispusieron las bandejas de bioensayo en una cámara ambiental mantenida a 28 °C, 50 % de HR y un fotoperiodo de 16 h:8 h (luz:oscuridad). Se registraron la mortalidad larval, peso larval y número de larvas supervivientes que no demostraron ganancias de peso (< 0,1 mg por larva) el séptimo día después de la inoculación. Se repitió cada combinación de estirpe de insecto/concentración de proteína Cry cuatro veces, con 16 a 32 larvas en cada repetición.

15 Se midieron los criterios de mortalidad larval como mortalidad “práctica”, que consideraba tanto las larvas muertas (mórbidas) como supervivientes (atrofiadas, sin alimentación) que no mostraban una ganancia significativa de peso corporal (concretamente, < 0,1 mg por larva). Se calculó la mortalidad práctica de las larvas en un tratamiento usando la ecuación:

20
$$\text{Mortalidad práctica (\%)} = [\text{TDS}/\text{TNIT}] \times 100$$

en la que TDS es el número total de larvas muertas más el número de larvas atrofiadas,

y TNIT es el número total de insectos en el tratamiento

25 La mortalidad “práctica” (simplificado de aquí en adelante como mortalidad) de cada cepa de *D. saccharalis* se corrigió para la mortalidad larval observada con dieta de control de blanco de agua para analizar los resultados después de tratamiento con Cry1Ab, o la dieta de tratamiento con solo tampón para el tratamiento de DIG-152.

Se analizaron adicionalmente los resultados de los experimentos de respuesta a la dosis para establecer el valor de GI₅₀, [concretamente, la concentración de proteína de Bt. en la dieta a la que la inhibición del crecimiento larval (% GI) era de 50]. Se calculó el valor de % GI de las larvas en la dieta que contenía proteína Cry1Ab usando la fórmula:

30
$$\%GI = [\text{TWC} - \text{TWT}]/\text{TWC} \times 100$$

en la que TWC es el peso corporal total de larvas que se alimentan con dieta de control de agua, y

TWT es el peso corporal total de larvas que se alimentan con dieta tratada con Cry1Ab

mientras que, para analizar el % GI larval como resultado de la ingestión de proteína DIG-152, se calculó usando la fórmula:

35
$$\%GI = [\text{TWB} - \text{TWT}]/\text{TWB} \times 100$$

en la que TWB es el peso corporal total de larvas que se alimentan con dieta tratada con control de solo tampón y

TWT es el peso corporal total de larvas que se alimentan con dieta tratada con DIG-152.

40 Se asignó una inhibición del crecimiento larval del 100 % a una repetición si no había larvas que tuvieran una ganancia de peso significativa (<0,1 mg por larva). Se analizaron los datos de inhibición del crecimiento usando un ANOVA de dos factores con cepa de insecto y concentración de proteína Cry como los dos factores principales. Se usaron pruebas de LSMEANS para determinar las diferencias de tratamiento a nivel de α= 0,05.

Se dan en la Tabla 2 los resultados de los bioensayos de incorporación a dieta en larvas de *Diatraea saccharalis*.

Tabla 2. Mortalidad larval de respuesta a la dosis e inhibición del crecimiento (% media \pm eem) de *Diatraea saccharalis* sensible a Cry1Ab (SCB) y resistente a Cry1Ab (rSCB) que se alimentan con dieta que contiene Cry1Ab o proteína DIG-152^a

Insecto	Proteína Cry1Ab				DIG-152			
	Conc. proteína ^b	Nº de larvas	Mortalidad ^c	% GI ^d	Conc. proteína ^b	Nº de larvas	Mortalidad ^c	% GI ^e
SCB	Blanco	126	3,2 \pm 1,3 a	---	Blanco	124	10,4 \pm 3,2 b	5,9 \pm 4,8 a
rSCB	Blanco	128	4,7 \pm 2,0	---	Blanco	125	4,1 \pm 2,5 a	3,1 \pm 5,5 a
SCB	Tampón	NT ^f			Tampón	121	10,9 \pm 3,9 b	---
rSCB	Tampón	NT			Tampón	127	1,6 \pm 0,9 a	---
SCB	0,03125	124	38,6 \pm 4,8 c	90,7 \pm 1,6 ef	0,03	126	53,1 \pm 2,3 c	69,5 \pm 6,5 c
rSCB	0,03125	123	8,3 \pm 3,2 ab	-15,9 \pm 4,6 a	0,03	127	3,2 \pm 0,0 a	8,0 \pm 5,1 a
SCB	0,125	128	34,3 \pm 7,9 c	87,4 \pm 2,5 e	0,1	127	88,2 \pm 3,5 d	100 \pm 0,0 d
rSCB	0,125	126	8,6 \pm 2,3 ab	10,0 \pm 5,3 b	0,1	127	11,8 \pm 0,8 b	49,0 \pm 3,5 b
SCB	0,5	119	75,6 \pm 2,9 e	94,3 \pm 1,0 fg	0,4	130	96,2 \pm 1,9 e	100 \pm 0,0 d
rSCB	0,5	128	5,5 \pm 1,5 a	26,7 \pm 3,1 c	0,4	125	91,2 \pm 2,0 d	100 \pm 0,0 d
SCB	2	125	93,6 \pm 2,2 f	100 \pm 0,0 g	1,6	122	100 \pm 0,0 f	100 \pm 0,0 d
rSCB	2	128	14,8 \pm 2,7 b	67,5 \pm 1,5 d	1,6	127	100 \pm 0,0 f	100 \pm 0,0 d
SCB	8	122	95,9 \pm 1,6 fg	100 \pm 0,0 g	6,4	125	100 \pm 0,0 f	100 \pm 0,0 d
rSCB	8	120	40,6 \pm 5,1 c	85,2 \pm 1,9 e	6,4	128	100 \pm 0,0 f	100 \pm 0,0 d
SCB	32	126	99,2 \pm 0,8 g	100 \pm 0,0 g	25,6	78	100 \pm 0,0 f	100 \pm 0,0 d
rSCB	32	128	60,9 \pm 5,8 d	90,3 \pm 2,2 ef	25,6	119	100 \pm 0,0 f	100 \pm 0,0 d
SCB					102	60	100 \pm 0,0 f	100 \pm 0,0 d
rSCB					102	126	100 \pm 0,0 f	100 \pm 0,0 d

	Proteína Cry1Ab				DIG-152					
Insecto	Conc. proteína ^b	de	Nº de larvas	Mortalidad ^c	% GI ^d	Conc. proteína ^b	de	Nº de larvas	Mortalidad ^c	% GI ^e
^a Los valores medios en una columna con todos los tratamientos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (P < 0,05; prueba de LSMEANS). eem = error estándar de la media. ^b µg de proteína/g de dieta. ^c La medida de la mortalidad larval era como se define en el texto. ^d Estos valores porcentuales se calcularon usando la fórmula descrita en el texto. ^e Estos valores porcentuales se calcularon usando la fórmula descrita en el texto. ^f NT = No ensayado										

5 Análisis de datos. Se sometieron los datos de dosis/mortalidad corregidos a análisis de probit para determinar las concentraciones de proteína de tratamiento que causaban un valor de 50 % de mortalidad (CL₅₀) y los correspondientes intervalos de confianza del 95 % (IC). Los tratamientos usados en el análisis de probit incluían la máxima concentración que producía cero mortalidad, la mínima concentración que daba como resultado un 100 % de mortalidad y todos los resultados entre estos extremos. Se calcularon las relaciones de resistencia dividiendo el valor de CL₅₀ de la cepa de rSCB entre el de insectos SCB. Se usó una prueba de relación de dosis letal para determinar si las relaciones de resistencia eran significativas al nivel de α= 0,05. Se usó también un ANOVA de dos factores para analizar los datos de mortalidad, seguido de una prueba de LSMEANS al nivel de α= 0,05 para determinar las diferencias de tratamiento. Se presentan en la Tabla 3 los resultados de los análisis.

10 **Tabla 3.** Compendio de pruebas de bioensayo sobre larvas de SCB y rSCB usando dieta de insecto en la que se ha incorporado proteína DIG-152 o proteína Cry1Ab.

	Insecto	Nº de larvas ensayadas	CL ₅₀ (IC del 95 %) (µg/g) ^a	RR ^b
DIG-152	SCB	505	0,03 (0,02-0,03)	6,0 NS
	rSCB	506	0,18 (0,15-0,24)	
Cry1Ab	SCB	744	0,13 (0,08-0,20)	142S
	rSCB	440	18,46 (13,93-26,29)	

^a La medida de la mortalidad larval se definió como se describe en el texto.
^b Las relaciones de resistencia con una letra "S" son significativas, mientras que aquellas con las letras "NS" son no significativas al nivel del 5 % basado en las pruebas de dosis letal.

15 Es un rasgo de la proteína DIG-152 de la invención en cuestión que inhibe el crecimiento de larvas de barrenador de caña de azúcar neonatas (*Diatraea saccharalis*), o las larvas mueren, después de la ingestión de proteína DIG-152 a niveles similares a los de proteína Cry1Ab activada, que da la misma respuesta biológica. Es un rasgo adicional de la proteína DIG-152 que las larvas de *Diatraea saccharalis* que son resistentes a los efectos tóxicos de la proteína Cry1Ab son no obstante sensibles a la acción tóxica de la proteína DIG-152.

Ejemplo 2

20 Construcción de plásmidos de expresión que codifican proteínas quiméricas y expresión en *Pseudomonas*

25 Se usaron métodos de clonación estándares [como se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, (1989) y Ausubel *et al.*, (1995), y actualizaciones de los mismos] en la construcción del constructo de expresión pMYC2547 de *Pseudomonas fluorescens* (Pf) genomanipulado para producir una proteína quimérica DIG-152 completa. Se efectuó la producción de proteína en *Pseudomonas fluorescens* cepa MB214 (un derivado de la cepa MB 101; *P. fluorescens* biovar I), que tiene una inserción de un operón *lac* modificado como se divulga en la patente de EE.UU.

n° 5169760. La estrategia de clonación básica conllevaba subclonar un fragmento de ADN que codifica DIG-152 en vectores de plásmido, con lo que se dispone bajo el control de expresión del promotor *Ptac* y el terminador *rrnBT1T2* del plásmido pKK223-3 (PL Pharmacia, Milwaukee, WI). Uno de dichos plásmidos se denominó pMYC2547, y el aislamiento MB214 que alberga este plásmido se denomina Dpf108.

5 Análisis de crecimiento y expresión en matraces agitados. Se logró la producción de proteína DIG-152 para caracterización y bioensayo de insectos mediante *P. fluorescens* cepa Dpf108 crecida en matraz agitado. Se realizó la producción de proteína DIG-152 estimulada por el promotor *Ptac* como se describe anteriormente en la patente de EE.UU. n° 5527883. Los detalles de las manipulaciones microbiológicas están disponibles en Squires *et al.*, (2004), solicitud de patente de EE.UU. 20060008877, solicitud de patente de EE.UU. 20080193974 y solicitud de patente de EE.UU. 20080058262, incorporadas a la presente como referencia. Se indujo la expresión mediante la adición de β -D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG) después de una incubación inicial de 24 horas a 30 °C con agitación. Se muestrearon los cultivos en el momento de inducción y en diversos momentos después de la inducción. Se midió la densidad celular mediante la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}).

15 Análisis de fraccionamiento celular y PAGE-SDS de muestras de matraz agitado. En cada momento de muestreo, se ajustó la densidad celular de las muestras a $DO_{600} = 20$ y se centrifugaron alícuotas de 1 ml a 14000 x g durante 5 minutos. Se congelaron los sedimentos celulares a -80 °C. Se generaron fracciones solubles e insolubles a partir de las muestras de sedimento de matraz agitado congeladas usando solución de extracción de proteína bacteriana EasyLyse™ (EPICENTRE® Biotechnologies, Madison, WI). Se resuspendió cada sedimento celular en 1 ml de solución EasyLyse™, se diluyó adicionalmente 1:4 en tampón de lisis y se incubó con agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se centrifugó el lisado a 14.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C y se recuperó el sobrenadante como la fracción soluble. Se resuspendió entonces el sedimento (fracción insoluble) en un volumen igual de solución salina tamponada con fosfato (PBS; Na_2HPO_4 11,9 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4).

25 Se mezclaron las muestras 1:1 con 2X tampón de muestra Laemmli que contiene β -mercaptoetanol (Sambrook *et al.*, *supra.*) y se hirvieron durante 5 minutos antes de cargar en geles Criterion XT con 12 % de Bis-Tris (Bio-Rad Inc., Hercules, CA). Se efectuó la electroforesis en tampón XT MOPS recomendado. Se tiñeron los geles con tinción Coomassie Bio-Safe según el protocolo del fabricante (Bio-Rad) y se tomaron imágenes usando el sistema Alpha Innotech Imaging (San Leandro, CA).

30 Preparación de cuerpos de inclusión. Se efectuaron preparaciones de cuerpos de inclusión (IB) de proteína DIG-152 en células de fermentaciones de *P. fluorescens* que producían proteína insecticida de *Bt* insoluble, como se demuestra por PAGE-SDS y MALDI-MS (desorción/ionización láser asistida por matriz/espectrometría de masas). Se descongelaron sedimentos de fermentación de *P. fluorescens* en un baño de agua a 37 °C. Se resuspendieron las células al 25 % p/v en tampón de lisis [Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM, sal disódica de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 20 mM, 1 % de Triton X-100 y ditiotreitól (DTT) 5 mM; se añadieron 5 ml/l de cóctel inhibidor de proteasa bacteriana (n° de catálogo P8465; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) justo antes del uso]. Se suspendieron las células usando un homogeneizador manual al ajuste menor (Tissue Tearor, BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK). Se añadió lisozima (25 mg de Sigma L7651, de yema de huevo) a la suspensión celular por mezclado con una espátula metálica, y se incubó la suspensión a temperatura ambiente durante 1 hora. Se enfrió la suspensión en hielo durante 15 minutos, se sometió entonces a sonicación usando un Branson Sonifier 250 (dos sesiones de 1 minuto a 50 % de ciclo de trabajo, 30 % de salida). Se comprobó la lisis celular por microscopio. Se añadieron 25 mg adicionales de lisozima si es necesario y se repitieron incubación y sonicación. Después de la confirmación de la lisis celular por microscopio, se centrifugó el lisado a 11.500 x g durante 25 minutos (4 °C) formando el sedimento de IB, y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento de IB con 100 ml de tampón de lisis, se homogeneizó con el mezclador manual y se centrifugó como anteriormente. Se lavó repetidamente el sedimento de IB por resuspensión (en 50 ml de tampón de lisis), homogeneización, sonicación y centrifugación hasta que el sobrenadante se volvió incoloro y el sedimento de IB se volvió firme y de color blanquecino. Para el lavado final, se resuspendió el sedimento de IB en agua destilada esterilizada por filtración (0,22 μ m) que contenía EDTA 2 mM y se centrifugó. Se resuspendió el sedimento final en agua destilada esterilizada por filtración que contenía EDTA 2 mM y se almacenó en alícuotas de 1 ml a -80 °C.

50 Se realizaron el análisis de PAGE-SDS y la cuantificación de proteína en preparaciones de IB descongelando una alícuota d 1 ml de sedimento de IB y diluyendo 1:20 con agua destilada esterilizada por filtración. Se hirvió entonces la muestra diluida con 4X tampón de muestra reductor [Tris 250 mM, pH 6,8, 40 % de glicerol (v/v), 0,4 % de azul de bromofenol (p/v), 8 % de SDS (p/v) y 8 % de β -mercaptoetanol (v/v)] y se cargó en un gel de 12 + 2 pocillos Novex® con Tris-glicina al 4-20 % (Invitrogen) resuelto con tampón 1X Tris/glicina/SDS (BioRad). Se resolvió el gel durante 60 min a 200 V y se tiñó entonces con azul de Coomassie (50 % de G-250/50 % de R-250 en metanol al 45 % y ácido acético al 10 %, y se destiñó con ácido acético al 7 % y metanol al 5 % en agua destilada. Se realizó la cuantificación de las bandas diana comparando los valores densitométricos para las bandas frente a muestras de patrón de seroalbúmina bovina (BSA) resueltas en el mismo gel para generar una curva patrón.

60 Solubilización de cuerpos de inclusión. Se centrifugaron 6 ml de suspensión de cuerpos de inclusión de DIG-152 del clon de Pf Dpf108 en el ajuste máximo de una microcentrifuga Eppendorf modelo 5415C (aproximadamente 14.000 x g) para sedimentar las inclusiones. Se retiró el sobrenadante de tampón de almacenamiento y se reemplazó por 25 ml de tampón carbonato de sodio 100 mM, pH 11 en un tubo cónico de 50 ml. Se resuspendieron las inclusiones

usando una pipeta y se agitaron con vórtex para mezclar completamente. Se dispuso el tubo en una plataforma oscilante suave a 4 °C durante una noche para extraer la proteína diana. Se centrifugó el extracto a 30.000 x g durante 30 min a 4 °C y se concentró el sobrenadante resultante 5 veces usando un dispositivo de filtro centrífugo con celulosa regenerada (corte de peso molecular 30.000; Millipore). Se cambió entonces el tampón de muestra por CAPS 10 mM [ácido 3-(ciclohexamino)-1-propanosulfónico] a pH 10 usando columnas PD-10 desechables (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Solubilización y activación con tripsina de la proteína de cuerpos de inclusión. En algunos casos, se centrifugó la suspensión de cuerpos de inclusión de DIG-152 del clon de Pf DPf108 al ajuste máximo de una microcentrífuga Eppendorf modelo 5415C (aproximadamente 14.000 x g) para sedimentar las inclusiones. Se retiró el sobrenadante de tampón de almacenamiento y se reemplazó por CAPS 100 mM, pH 11, proporcionando una concentración de proteína de aproximadamente 50 mg/ml. Se hizo oscilar el tubo a temperatura ambiente durante 3 horas para solubilizar completamente la proteína. Se añadió tripsina a una cantidad igual a un 5 a 10 % (p:p, basado en el peso inicial de polvo de IB) y se logró la digestión por incubación con oscilación durante una noche a 4 °C o por oscilación durante 90-120 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el material insoluble por centrifugación a 10.000 x g durante 15 minutos y se aplicó el sobrenadante a una columna de intercambio aniónico MonoQ (10 mm por 10 cm). Se eluyó proteína DIG-152 activada (como se determina por PAGE-SDS, véase a continuación) con un gradiente de NaCl 1 M de 0 a 100 % durante 25 volúmenes de columna. Se combinaron las fracciones que contienen la proteína activada y, cuando era necesario, se concentraron a menos de 10 ml usando un dispositivo de filtro centrífugo con celulosa regenerada Amicon Ultra-15 como anteriormente. Se pasó entonces el material a través de una columna Superdex 200 (16 mm por 60 cm) en tampón que contiene NaCl 100 mM, 10 % de glicerol, 0,5 % de Tween-20 y EDTA 1 mM. Se determinó por análisis de PAGE-SDS que la proteína activada (truncada enzimáticamente) eluye a 65 a 70 ml. Se combinaron las fracciones que contienen proteína activada y se concentraron usando el concentrador centrífugo como anteriormente.

Electroforesis en gel. Se prepararon las preparaciones de proteína concentrada para electroforesis diluyendo 1:50 en tampón de muestra NuPAGE® LDS (Invitrogen) que contiene DTT 5 mM como agente reductor y se calentó a 95 °C durante 4 minutos. Se cargó la muestra en carriles repetidos de un gel NuPAGE® al 4-12 % junto con 5 patrones de BSA en el intervalo de 0,2 µg a 2 µg/carril (para la generación de curva patrón). Se aplicó voltaje a 200 V usando tampón de resolución MOPS SDS (Invitrogen) hasta que el tinte de seguimiento alcanzara el fondo del gel. Se tiñó el gel con azul de Coomassie G-250 al 0,2 % en metanol al 45 % y ácido acético al 10 % y se destiñó, en primer lugar brevemente con metanol al 45 % y ácido acético al 10 % y después extensamente con ácido acético al 7 % y metanol al 5 %, hasta que se eliminó el fondo. Después de la destinción, se barrió el gel con un BioRad Fluor-S Multilmager. Se usó el software Quantity One v.4.5.2 del instrumento para obtener los volúmenes con fondo restado de las bandas de proteína teñidas y para generar la curva patrón de BSA que se usó para calcular la concentración de proteína DIG-152 química en la solución madre.

Ejemplo 3

Preparación de las proteínas de núcleo de toxina Cry1Ca y Cry1Ab y aislamiento de vesículas de membrana de borde en cepillo de *Spodoptera frugiperda* para uso en experimentos de unión competitiva

Los siguientes ejemplos evalúan la unión competitiva de proteínas de núcleo de toxina Cry1 a presuntos receptores en tejidos de intestino de insecto. Se muestra que la proteína de núcleo de toxina Cry1Ca marcada con 125I se une con alta afinidad a vesículas de membrana de borde en cepillo (BBMV) preparadas a partir de *Spodoptera frugiperda* (cogollero del maíz) y que la proteína de núcleo de toxina Cry1Ab no compite con esta unión. Como alternativa, se muestra que la proteína de núcleo de toxina Cry1Ab marcada con 125I se une con alta afinidad a BBMV preparadas a partir de *S. frugiperda* y que la proteína de núcleo de toxina Cry1Ca no compite con esta unión.

Purificación de proteínas Cry. Se expresó un gen que codifica una proteína química DIG-152, que comprende el núcleo de toxina Cry1Ca3 y la protoxina Cry1Ab, en la cepa de expresión de *Pseudomonas fluorescens* como se describe en el Ejemplo 2. De forma similar, se expresó un gen que codifica una proteína Cry1Ab en el sistema Pf. La cepa de *P. fluorescens* que expresa la proteína Cry1Ab se denominó DPf88.

Se purificaron las proteínas mediante los métodos del Ejemplo 2, se efectuó entonces una digestión con tripsina para producir núcleos de toxina activada a partir de proteínas completas y se purificaron los productos mediante los métodos descritos en el Ejemplo 2. Las preparaciones de las proteínas procesadas con tripsina (núcleo de toxina activada) eran >95 % puras y tenían un peso molecular de aproximadamente 65 kDa como se determina experimentalmente por PAGE-SDS. Como se usa en la presente memoria, el núcleo de toxina activada preparado a partir de la proteína DIG-152 se denomina proteína de núcleo de toxina Cry1Ca, y el núcleo de toxina activada preparado a partir de la proteína Cry1Ab se denomina proteína de núcleo de toxina Cry1Ab.

Preparación y fraccionamiento de BBMV solubilizadas. Se emplearon métodos estándares de cuantificación de proteína y electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida como se enseña, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (1989) y Ausubel *et al.* (1995), y las actualizaciones de los mismos.

Se hicieron ayunar durante una noche larvas de último estadio de *S. frugiperda* y se diseccionaron entonces

después de enfriar en hielo durante 15 minutos. Se retiró el tejido del intestino medio de la cavidad corporal, dejando atrás el intestino caudal unido al integumento. Se dispuso el intestino medio en 9X volúmenes de tampón de homogeneización enfriado con hielo (manitol 300 mM, EGTA 5 mM, base Tris 17 mM, pH 7,5), suplementando con cóctel inhibidor de proteasa (Sigma-Aldrich P-2714) diluido como se recomienda por el proveedor. Se homogeneizó el tejido con 15 golpes de un homogeneizador de tejido de vidrio. Se prepararon las BBMV mediante el método de precipitación con $MgCl_2$ de Wolfersberger (1993). Brevemente, se mezcló un volumen igual de una solución de $MgCl_2$ 24 mM en manitol 300 mM con el homogeneizado de intestino medio, se agitó durante 5 minutos y se dejó reposar en hielo durante 15 min. Se centrifugó la solución a 2.500 x g durante 15 min a 4 °C. Se guardó el sobrenadante y se suspendió el sedimento en el volumen original o 0,5X tampón de homogeneización diluido y se centrifugó de nuevo. Se combinaron los dos sobrenadantes y se centrifugaron a 27.000 x g durante 30 min a 4 °C formando la fracción de BBMV. Se suspendió el sedimento en tampón de almacenamiento de BBMV (HEPES 10 mM, KCl 130 mM, 10 % de glicerol, pH 7,4) a una concentración de proteína de aproximadamente 3 mg/ml. Se determinó la concentración de proteína usando seroalbúmina bovina (BSA) como patrón. Se realizó la determinación de fosfatasa alcalina (una enzima marcador de la fracción de BBMV) antes de congelar las muestras usando el kit de ensayo de fosfatasa alcalina QuantiChrom™ DALP-250 (Gentaur Molecular Products, Kampenhout, BE) siguiendo las instrucciones del fabricante. La actividad específica de esta enzima aumentaba típicamente 7 veces en comparación con la encontrada en la fracción de homogeneizado de intestino medio de partida. Se tomaron alícuotas de las BBMV en muestras de 250 μ l, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

Electroforesis. Se realizó el análisis de proteínas por PAGE-SDS en condiciones reductoras (concretamente, en 5 % de β -mercaptoetanol, BME) y desnaturalizantes (concretamente, calentadas 5 minutos a 90 °C en presencia de SDS al 2 %). Se cargaron las proteínas en pocillos de un gel de poliacrilamida/Tris-glicina al 4 a 20 % (BioRad; Hercules, CA) y se separaron a 200 V durante 60 minutos. Se detectaron las bandas de proteína por tinción con azul brillante de Coomassie R-250 (BioRad) durante 1 hora, y se destiñeron con una solución de metanol al 5 % en ácido acético al 7 %. Se tomaron imágenes de los geles y se analizaron usando un BioRad Fluro-S Multi Imager™. Se determinaron los pesos moleculares relativos de las bandas de proteína por comparación con las movilidades de proteínas de peso molecular conocido en una muestra de escala de proteínas BenchMark™ (Life Technologies, Rockville, MD) cargada en un pocillo del gel.

Yodación de las proteínas de núcleo de toxina Cry1Ca o Cry1Ab. Se yodaron la proteína de núcleo de toxina Cry1Ca o la proteína de núcleo de toxina Cry1Ab purificadas usando perlas de yodación de Pierce (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Brevemente, se lavaron dos perlas de yodación con 500 μ l de PBS (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,5) y se dispusieron en un tubo de centrifuga de 1,5 ml con 100 μ l de PBS. Se añadieron 0,5 mCi de yoduro de sodio marcado con ^{125}I , se dejaron reaccionar los componentes durante 5 minutos a temperatura ambiente y se añadió entonces 1 μ g de proteína de núcleo de toxina Cry1Ca (o 1 μ g de proteína de núcleo de toxina Cry1Ab) a la solución y se dejó reaccionar durante 3 a 5 minutos adicionales. Se terminó la reacción pipeteando la solución de las perlas de yodación y aplicándola a una columna de centrifugación Zeba™ (Invitrogen) equilibrada con CAPS 50 mM, pH 10,0, DTT (ditiotreitól) 1 mM, EDTA 1 mM y 5 % de glicerol. Se lavaron las perlas de yodación dos veces con 10 μ l de PBS y se aplicó también la solución de lavado a la columna de desalado Zeba™. Se eluyó la solución radiactiva a través de la columna de centrifugación centrifugando a 1.000 x g durante 2 min. Se dializó entonces la proteína de núcleo de toxina Cry1Ca radiomarcada con ^{125}I (o proteína de núcleo de toxina Cry1Ab) frente a CAPS 50 mM, pH 10, DTT 0,1 mM, EDTA 1 mM y 5 % de glicerol.

Formación de imágenes. Se determinó la radiopureza de las proteínas de núcleo de toxina Cry1Ca o Cry1Ab yodadas por PAGE-SDS y formación de fosforimágenes. Brevemente, se secaron geles de PAGE-SDS usando un aparato de secado de gel BioRad siguiendo las instrucciones del fabricante. Se tomaron imágenes de los geles secados envolviéndolos en película Mylar (12 μ m de grosor) y exponiéndolas a una pantalla de fósforo de almacenamiento de Molecular Dynamics (35 cm x 43 cm) durante 1 hora. Se revelaron las placas usando un Molecular Dynamics Storm 820 Phosphorimager y se analizó la imagen usando el software ImageQuant™.

Ejemplo 4

Unión de la proteína de núcleo de toxina Cry1 marcada con ^{125}I a BBMV de *Spodoptera frugiperda*

Se generó una curva de saturación para determinar la cantidad óptima de proteína de BBMV para uso en los ensayos de unión con proteínas de núcleo de toxina Cry1Ca y Cry1Ab. Se incubó proteína de núcleo de toxina Cry1 radiomarcada con ^{125}I 0,5 nM durante 1 h a 28 °C en tampón de unión (NaH_2PO_4 8 mM, KH_2PO_4 2 mM, NaCl 150 mM, 0,1 % de BSA, pH 7,4) con cantidades de proteína de BBMV en el intervalo de 0 μ g/ml a 500 μ g/ml (volumen total de 0,5 ml). Se separó la proteína de núcleo de toxina Cry marcada con ^{125}I unida a las proteínas de BBMV de la fracción no unida muestreando 150 μ l de la mezcla de reacción por triplicado en tubos de centrifuga de 1,5 ml separados y centrifugando las muestras a 14.000 x g durante 8 minutos a temperatura ambiente. Se retiró suavemente el sobrenadante y se lavó el sedimento tres veces con tampón de unión enfriado con hielo. Se cortó el fondo del tubo de centrifuga que contiene el sedimento, se dispuso en un tubo de cultivo de vidrio de 13 x 75 mm y se contaron las muestras durante 5 minutos cada una en el contador gamma. Se representaron las CPM (cuentas por minuto) obtenidas menos las CPM de fondo (reacción sin proteínas de BBMV) frente a la concentración de proteína de BBMV. De acuerdo con los resultados reseñados por otros (Luo *et al.* 1999), se determinó que la

concentración óptima de proteína de BBMV para uso en los ensayos de unión era de 150 µg/ml.

Ejemplo 5

Ensayos de unión competitiva a BBMV de *S. frugiperda* con proteínas de núcleo de toxina Cry1Ab y Cry1Ca

5 Se realizaron ensayos de unión competitiva homóloga y heteróloga usando proteína de BBMV de *S. frugiperda* 150 µg/ml y proteína de núcleo de toxina Cry1Ca radiomarcada con 125I 0,5 nM. Las concentraciones de proteína de núcleo de toxina Cry1Ab no radiomarcada competitiva añadidas a la mezcla de reacción estaban en el intervalo de 0,045 nM a 300 nM y se añadieron al mismo tiempo que la proteína de núcleo de toxina Cry1Ca radiactiva, para asegurar una competición de unión verdadera. Se llevaron a cabo las incubaciones durante 1 h a 28 °C y se midió la cantidad de proteína de núcleo de toxina Cry1Ca marcada con 125I unida a BBMV (unión específica) como se describe anteriormente. La unión no específica se representó por las cuentas obtenidas en presencia de proteína de núcleo de toxina Cry1Ca no radiomarcada. Se consideró que un 100 % de unión total era la cantidad de unión en ausencia de cualquier proteína de núcleo de toxina de Cry1Ab competidora.

15 Los ensayos de unión a receptor usando proteína de núcleo de toxina Cry1Ca marcada con 125I determinaron la capacidad de la proteína de núcleo de toxina Cry1Ab de desplazar este ligando radiomarcado de su sitio de unión en BBMV de *S. frugiperda*. Los resultados (**Figura 1**) muestran que la proteína de núcleo de toxina Cry1Ab no desplazaba la proteína de núcleo de toxina Cry1Ca marcada con 125I de su proteína o proteínas receptoras a concentraciones tan altas como 300 nM (600 veces la concentración del ligando de unión radiactivo). Como se esperaba, la proteína de núcleo de toxina Cry1Ca no marcada era capaz de desplazar la proteína de núcleo de toxina Cry1Ca radiomarcada de su proteína o proteínas de unión, exhibiendo una curva de respuesta a la dosis sigmoidea, apareciendo un 50 % de desplazamiento a 5 nM.

20 Está por tanto indicado que la proteína de núcleo de toxina Cry1Ca interacciona con un sitio de unión en BBMV de *S. frugiperda* al que no se une la proteína de núcleo de toxina Cry1Ab.

Ejemplo 6

Ensayos de unión competitiva a BBMV de *S. frugiperda* con las proteínas de núcleo de toxina Cry1Ca y Cry1Ab

25 Se realizaron ensayos de unión competitiva homóloga y heteróloga usando proteína de BBMV de *S. frugiperda* 150 µg/ml y proteína de núcleo de toxina Cry1Ca radiomarcada con 125I 0,5 nM. Las concentraciones de proteína de núcleo de toxina Cry1Ca no radiomarcada competitiva añadidas a la mezcla de reacción estaban en el intervalo de 0,045 nM a 1000 nM y se añadieron al mismo tiempo que la proteína de núcleo de toxina Cry1Ab radiactiva, para asegurar una competición de unión verdadera. Se llevaron a cabo las incubaciones durante 1 h a 28 °C y se midió la cantidad de proteína de núcleo de toxina Cry1Ab marcada con 125I unida a BBMV (unión específica) como se describe anteriormente. La unión no específica se representó por las cuentas obtenidas en presencia de proteína de núcleo de toxina Cry1Ab no radiomarcada 1000 nM. Se consideró que un 100 % de unión total era la cantidad de unión en ausencia de cualquier proteína de núcleo de toxina de Cry1Ca competidora.

35 Los ensayos de unión a receptor usando proteína de núcleo de toxina Cry1Ab marcada con 125I determinaron la capacidad de la proteína de núcleo de toxina Cry1Ca de desplazar este ligando radiomarcado de su sitio de unión en BBMV de *S. frugiperda*. Los resultados (**Figura 2**) muestran que la proteína de núcleo de toxina Cry1Ca no desplazaba la proteína de núcleo de toxina Cry1Ab marcada con 125I de su proteína o proteínas receptoras a concentraciones tan altas como 300 nM (600 veces la concentración del ligando de unión radiactivo). Como se esperaba, la proteína de núcleo de toxina Cry1Ab no marcada era capaz de desplazar la proteína de núcleo de toxina Cry1Ab radiomarcada de su proteína o proteínas de unión, exhibiendo una curva de respuesta a la dosis sigmoidea, apareciendo un 50 % de desplazamiento a 5 nM.

40 Está por tanto indicado que la proteína de núcleo de toxina Cry1Ab interacciona con un sitio de unión en BBMV de *S. frugiperda* que no se une a la proteína de núcleo de toxina Cry1Ca.

45

Listado de Secuencias

- <110> Dow AGROSCIENCES LLC
- 5 <120> USO COMBINADO DE CRY1CA Y CRY1AB PARA LA GESTIÓN DE INSECTOS RESISTENTES
- <130> DAS-P0162-US-02
- <160> 3
- 10 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 1164
- 15 <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Proteína quimérica DIG-152
- 20 <400> 1

```

Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu
1          5          10          15

Ser Asn Pro Glu Glu Val Leu Leu Asp Gly Glu Arg Ile Ser Thr Gly
          20          25          30

Asn Ser Ser Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Val Gln Phe Leu Val Ser
          35          40          45

Asn Phe Val Pro Gly Gly Gly Phe Leu Val Gly Leu Ile Asp Phe Val
          50          55          60

Trp Gly Ile Val Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile
65          70          75          80

Glu Gln Leu Ile Asn Glu Arg Ile Ala Glu Phe Ala Arg Asn Ala Ala
          85          90          95

Ile Ala Asn Leu Glu Gly Leu Gly Asn Asn Phe Asn Ile Tyr Val Glu
          100          105          110

Ala Phe Lys Glu Trp Glu Glu Asp Pro Lys Asn Pro Ala Thr Arg Thr
          115          120          125

Arg Val Ile Asp Arg Phe Arg Ile Leu Asp Gly Leu Leu Glu Arg Asp
130          135          140

Ile Pro Ser Phe Arg Ile Ser Gly Phe Glu Val Pro Leu Leu Ser Val
145          150          155          160

Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ala Ile Leu Arg Asp Ser Val

```

ES 2 598 491 T3

			165						170					175	
Ile	Phe	Gly	Glu	Arg	Trp	Gly	Leu	Thr	Thr	Ile	Asn	Val	Asn	Glu	Asn
			180					185					190		
Tyr	Asn	Arg	Leu	Ile	Arg	His	Ile	Asp	Glu	Tyr	Ala	Asp	His	Cys	Ala
		195					200					205			
Asn	Thr	Tyr	Asn	Arg	Gly	Leu	Asn	Asn	Leu	Pro	Lys	Ser	Thr	Tyr	Gln
	210					215					220				
Asp	Trp	Ile	Thr	Tyr	Asn	Arg	Leu	Arg	Arg	Asp	Leu	Thr	Leu	Thr	Val
225					230				235						240
Leu	Asp	Ile	Ala	Ala	Phe	Phe	Pro	Asn	Tyr	Asp	Asn	Arg	Arg	Tyr	Pro
			245						250					255	
Ile	Gln	Pro	Val	Gly	Gln	Leu	Thr	Arg	Glu	Val	Tyr	Thr	Asp	Pro	Leu
			260					265					270		
Ile	Asn	Phe	Asn	Pro	Gln	Leu	Gln	Ser	Val	Ala	Gln	Leu	Pro	Thr	Phe
		275					280					285			
Asn	Val	Met	Glu	Asn	Ser	Ala	Ile	Arg	Asn	Pro	His	Leu	Phe	Asp	Ile
	290					295					300				
Leu	Asn	Asn	Leu	Thr	Ile	Phe	Thr	Asp	Trp	Phe	Ser	Val	Gly	Arg	Asn
305					310					315					320
Phe	Tyr	Trp	Gly	Gly	His	Arg	Val	Ile	Ser	Ser	Leu	Ile	Gly	Gly	Gly
			325						330					335	
Asn	Ile	Thr	Ser	Pro	Ile	Tyr	Gly	Arg	Glu	Ala	Asn	Gln	Glu	Pro	Pro
			340					345					350		
Arg	Ser	Phe	Thr	Phe	Asn	Gly	Pro	Val	Phe	Arg	Thr	Leu	Ser	Asn	Pro
		355					360					365			
Thr	Leu	Arg	Leu	Leu	Gln	Gln	Pro	Trp	Pro	Ala	Pro	Pro	Phe	Asn	Leu
	370					375					380				
Arg	Gly	Val	Glu	Gly	Val	Glu	Phe	Ser	Thr	Pro	Thr	Asn	Ser	Phe	Thr
385					390					395					400
Tyr	Arg	Gly	Arg	Gly	Thr	Val	Asp	Ser	Leu	Thr	Glu	Leu	Pro	Pro	Glu
				405					410					415	
Asp	Asn	Ser	Val	Pro	Pro	Arg	Glu	Gly	Tyr	Ser	His	Arg	Leu	Cys	His
			420					425					430		

ES 2 598 491 T3

Ala Thr Phe Val Gln Arg Ser Gly Thr Pro Phe Leu Thr Thr Gly Val
 435 440 445

Val Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Thr Leu Thr Asn Thr Ile Asp
 450 455 460

Pro Glu Arg Ile Asn Gln Ile Pro Leu Val Lys Gly Phe Arg Val Trp
 465 470 475 480

Gly Gly Thr Ser Val Ile Thr Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile
 485 490 495

Leu Arg Arg Asn Thr Phe Gly Asp Phe Val Ser Leu Gln Val Asn Ile
 500 505 510

Asn Ser Pro Ile Thr Gln Arg Tyr Arg Leu Arg Phe Arg Tyr Ala Ser
 515 520 525

Ser Arg Asp Ala Arg Val Ile Val Leu Thr Gly Ala Ala Ser Thr Gly
 530 535 540

Val Gly Gly Gln Val Ser Val Asn Met Pro Leu Gln Lys Thr Met Glu
 545 550 555 560

Ile Gly Glu Asn Leu Thr Ser Arg Thr Phe Arg Tyr Thr Asp Phe Ser
 565 570 575

Asn Pro Phe Ser Phe Arg Ala Asn Pro Asp Ile Ile Gly Ile Ser Glu
 580 585 590

Gln Pro Leu Phe Gly Ala Gly Ser Ile Ser Ser Gly Glu Leu Tyr Ile
 595 600 605

Asp Lys Ile Glu Ile Ile Leu Ala Asp Ala Thr Phe Glu Ala Glu Ser
 610 615 620

Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Thr Ser Ser
 625 630 635 640

Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Arg
 645 650 655

Val Ser Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu
 660 665 670

Lys Lys Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys His Ala Lys Arg Leu Ser Asp
 675 680 685

ES 2 598 491 T3

Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln
 690 695 700

Leu Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly
 705 710 715 720

Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val Thr Leu Leu Gly Thr Phe Asp
 725 730 735

Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu
 740 745 750

Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln
 755 760 765

Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Val
 770 775 780

Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Ala Pro Ser Pro
 785 790 795 800

Ile Gly Lys Cys Ala His His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile Asp
 805 810 815

Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile Phe
 820 825 830

Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe
 835 840 845

Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg
 850 855 860

Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu Thr
 865 870 875 880

Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe Val
 885 890 895

Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile
 900 905 910

His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro
 915 920 925

Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu Leu
 930 935 940

ES 2 598 491 T3

Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val
 945 950 955 960

Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys
 965 970 975

Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His Arg Ser Val Leu Val
 980 985 990

Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro
 995 1000 1005

Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr
 1010 1015 1020

Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp
 1025 1030 1035

Glu Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu Val Tyr Pro Asn
 1040 1045 1050

Asn Thr Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Ala Thr Gln Glu Glu Tyr
 1055 1060 1065

Glu Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asp Gly Ala Tyr
 1070 1075 1080

Glu Ser Asn Ser Ser Val Pro Ala Asp Tyr Ala Ser Ala Tyr Glu
 1085 1090 1095

Glu Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Asp Asn Pro Cys Glu Ser
 1100 1105 1110

Asn Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val
 1115 1120 1125

Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile
 1130 1135 1140

Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu
 1145 1150 1155

Leu Leu Leu Met Glu Glu
 1160

- <210> 2
- <211> 619
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- <220>
- 10 <223> Cry1Ca

<400> 2

ES 2 598 491 T3

Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu
1 5 10 15

Ser Asn Pro Glu Glu Val Leu Leu Asp Gly Glu Arg Ile Ser Thr Gly
20 25 30

Asn Ser Ser Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Val Gln Phe Leu Val Ser
35 40 45

Asn Phe Val Pro Gly Gly Gly Phe Leu Val Gly Leu Ile Asp Phe Val
50 55 60

Trp Gly Ile Val Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile
65 70 75 80

Glu Gln Leu Ile Asn Glu Arg Ile Ala Glu Phe Ala Arg Asn Ala Ala
85 90 95

Ile Ala Asn Leu Glu Gly Leu Gly Asn Asn Phe Asn Ile Tyr Val Glu
100 105 110

Ala Phe Lys Glu Trp Glu Glu Asp Pro Lys Asn Pro Ala Thr Arg Thr
115 120 125

Arg Val Ile Asp Arg Phe Arg Ile Leu Asp Gly Leu Leu Glu Arg Asp
130 135 140

Ile Pro Ser Phe Arg Ile Ser Gly Phe Glu Val Pro Leu Leu Ser Val
145 150 155 160

Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ala Ile Leu Arg Asp Ser Val
165 170 175

Ile Phe Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Thr Ile Asn Val Asn Glu Asn
180 185 190

Tyr Asn Arg Leu Ile Arg His Ile Asp Glu Tyr Ala Asp His Cys Ala
195 200 205

Asn Thr Tyr Asn Arg Gly Leu Asn Asn Leu Pro Lys Ser Thr Tyr Gln
210 215 220

Asp Trp Ile Thr Tyr Asn Arg Leu Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val
225 230 235 240

ES 2 598 491 T3

Leu Asp Ile Ala Ala Phe Phe Pro Asn Tyr Asp Asn Arg Arg Tyr Pro
 245 250 255

Ile Gln Pro Val Gly Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Thr Asp Pro Leu
 260 265 270

Ile Asn Phe Asn Pro Gln Leu Gln Ser Val Ala Gln Leu Pro Thr Phe
 275 280 285

Asn Val Met Glu Asn Ser Ala Ile Arg Asn Pro His Leu Phe Asp Ile
 290 295 300

Leu Asn Asn Leu Thr Ile Phe Thr Asp Trp Phe Ser Val Gly Arg Asn
 305 310 315 320

Phe Tyr Trp Gly Gly His Arg Val Ile Ser Ser Leu Ile Gly Gly Gly
 325 330 335

Asn Ile Thr Ser Pro Ile Tyr Gly Arg Glu Ala Asn Gln Glu Pro Pro
 340 345 350

Arg Ser Phe Thr Phe Asn Gly Pro Val Phe Arg Thr Leu Ser Asn Pro
 355 360 365

Thr Leu Arg Leu Leu Gln Gln Pro Trp Pro Ala Pro Pro Phe Asn Leu
 370 375 380

Arg Gly Val Glu Gly Val Glu Phe Ser Thr Pro Thr Asn Ser Phe Thr
 385 390 395 400

Tyr Arg Gly Arg Gly Thr Val Asp Ser Leu Thr Glu Leu Pro Pro Glu
 405 410 415

Asp Asn Ser Val Pro Pro Arg Glu Gly Tyr Ser His Arg Leu Cys His
 420 425 430

Ala Thr Phe Val Gln Arg Ser Gly Thr Pro Phe Leu Thr Thr Gly Val
 435 440 445

Val Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Thr Leu Thr Asn Thr Ile Asp
 450 455 460

Pro Glu Arg Ile Asn Gln Ile Pro Leu Val Lys Gly Phe Arg Val Trp
 465 470 475 480

Gly Gly Thr Ser Val Ile Thr Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile
 485 490 495

ES 2 598 491 T3

Leu Arg Arg Asn Thr Phe Gly Asp Phe Val Ser Leu Gln Val Asn Ile
500 505 510

Asn Ser Pro Ile Thr Gln Arg Tyr Arg Leu Arg Phe Arg Tyr Ala Ser
515 520 525

Ser Arg Asp Ala Arg Val Ile Val Leu Thr Gly Ala Ala Ser Thr Gly
530 535 540

Val Gly Gly Gln Val Ser Val Asn Met Pro Leu Gln Lys Thr Met Glu
545 550 555 560

Ile Gly Glu Asn Leu Thr Ser Arg Thr Phe Arg Tyr Thr Asp Phe Ser
565 570 575

Asn Pro Phe Ser Phe Arg Ala Asn Pro Asp Ile Ile Gly Ile Ser Glu
580 585 590

Gln Pro Leu Phe Gly Ala Gly Ser Ile Ser Ser Gly Glu Leu Tyr Ile
595 600 605

Asp Lys Ile Glu Ile Ile Leu Ala Asp Ala Thr
610 615

5 <210> 3
<211> 612
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Cry1Ab

<400> 3

Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu
1 5 10 15

Ser Asn Pro Glu Val Glu Val Leu Gly Gly Glu Arg Ile Glu Thr Gly
20 25 30

Tyr Thr Pro Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Gln Phe Leu Leu Ser
35 40 45

Glu Phe Val Pro Gly Ala Gly Phe Val Leu Gly Leu Val Asp Ile Ile
50 55 60

Trp Gly Ile Phe Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile
65 70 75 80

Glu Gln Leu Ile Asn Gln Arg Ile Glu Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala
85 90 95

15

ES 2 598 491 T3

Ile Ser Arg Leu Glu Gly Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Ile Tyr Ala Glu
100 105 110

Ser Phe Arg Glu Trp Glu Ala Asp Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu
115 120 125

Glu Met Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala Leu Thr Thr Ala
130 135 140

Ile Pro Leu Phe Ala Val Gln Asn Tyr Gln Val Pro Leu Leu Ser Val
145 150 155 160

Tyr Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Val Leu Arg Asp Val Ser
165 170 175

Val Phe Gly Gln Arg Trp Gly Phe Asp Ala Ala Thr Ile Asn Ser Arg
180 185 190

Tyr Asn Asp Leu Thr Arg Leu Ile Gly Asn Tyr Thr Asp Tyr Ala Val
195 200 205

Arg Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg Val Trp Gly Pro Asp Ser Arg
210 215 220

Asp Trp Val Arg Tyr Asn Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val
225 230 235 240

Leu Asp Ile Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Ser Arg Arg Tyr Pro
245 250 255

Ile Arg Thr Val Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asn Pro Val
260 265 270

Leu Glu Asn Phe Asp Gly Ser Phe Arg Gly Ser Ala Gln Gly Ile Glu
275 280 285

Arg Ser Ile Arg Ser Pro His Leu Met Asp Ile Leu Asn Ser Ile Thr
290 295 300

Ile Tyr Thr Asp Ala His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Trp Ser Gly His Gln
305 310 315 320

Ile Met Ala Ser Pro Val Gly Phe Ser Gly Pro Glu Phe Thr Phe Pro
325 330 335

Leu Tyr Gly Thr Met Gly Asn Ala Ala Pro Gln Gln Arg Ile Val Ala
340 345 350

ES 2 598 491 T3

Gln Leu Gly Gln Gly Val Tyr Arg Thr Leu Ser Ser Thr Leu Tyr Arg
 355 360 365

Arg Pro Phe Asn Ile Gly Ile Asn Asn Gln Gln Leu Ser Val Leu Asp
 370 375 380

Gly Thr Glu Phe Ala Tyr Gly Thr Ser Ser Asn Leu Pro Ser Ala Val
 385 390 395 400

Tyr Arg Lys Ser Gly Thr Val Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln
 405 410 415

Asn Asn Asn Val Pro Pro Arg Gln Gly Phe Ser His Arg Leu Ser His
 420 425 430

Val Ser Met Phe Arg Ser Gly Phe Ser Asn Ser Ser Val Ser Ile Ile
 435 440 445

Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp Ile His Arg Ser Ala Glu Phe Asn Asn
 450 455 460

Ile Ile Pro Ser Ser Gln Ile Thr Gln Ile Pro Leu Thr Lys Ser Thr
 465 470 475 480

Asn Leu Gly Ser Gly Thr Ser Val Val Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly
 485 490 495

Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Pro Gly Gln Ile Ser Thr Leu Arg
 500 505 510

Val Asn Ile Thr Ala Pro Leu Ser Gln Arg Tyr Arg Val Arg Ile Arg
 515 520 525

Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Gln Phe His Thr Ser Ile Asp Gly Arg
 530 535 540

Pro Ile Asn Gln Gly Asn Phe Ser Ala Thr Met Ser Ser Gly Ser Asn
 545 550 555 560

Leu Gln Ser Gly Ser Phe Arg Thr Val Gly Phe Thr Thr Pro Phe Asn
 565 570 575

Phe Ser Asn Gly Ser Ser Val Phe Thr Leu Ser Ala His Val Phe Asn
 580 585 590

Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Phe Val Pro Ala Glu
 595 600 605

Val Thr Phe Glu

610

REIVINDICACIONES

1. Una planta transgénica que comprende ADN que codifica una proteína insecticida Cry1C que comprende una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO: 2 y variantes de la misma, ADN que codifica una proteína insecticida Cry1Ab que comprende una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO: 3 y variantes de la misma y cualquiera de ADN que codifica una proteína insecticida Cry1Fa1 que comprende una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO: 4 y variantes de la misma o ADN que codifica una proteína insecticida Cry1Fa2 que comprende una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO: 5 y variantes de la misma, en la que las variantes comprenden una secuencia aminoacídica que tiene más de un 90 % de homología de secuencia con la secuencia aminoacídica según las SEQ ID NO: 2, 3, 4 y 5, respectivamente, y que tiene la misma actividad insecticida que las proteínas respectivas.
2. Semilla de una planta de la reivindicación 1 que comprende ADN que codifica una proteína insecticida Cry1C según la SEQ ID NO: 2 y variantes de la misma, que comprende ADN que codifica una proteína insecticida Cry1Ab según la SEQ ID NO: 3 y variantes de la misma y que comprende ADN que codifica una proteína insecticida Cry1Fa1 según la SEQ ID NO: 4 y variantes de la misma o ADN que codifica una proteína insecticida Cry1Fa2 que comprende una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO: 5 y variantes de la misma, en la que las variantes comprenden una secuencia aminoacídica que tiene más de un 90 % de homología de secuencia con la secuencia aminoacídica según las SEQ ID NO: 2, 3, 4 y 5, respectivamente, y que tiene la misma actividad insecticida que las proteínas respectivas.
3. Una mezcla de semillas que comprende semillas de refugio de plantas de refugio sin Bt y una pluralidad de semillas de la reivindicación 2, en la que dichas semillas de refugio comprenden entre 5 y 40 % de todas las semillas en la mezcla.
4. Una composición para controlar plagas de lepidópteros que comprende células que expresan cantidades eficaces tanto de una proteína que contiene el núcleo de toxina Cry1Ab que comprende una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO: 2 y variantes de la misma, una proteína que contiene el núcleo de toxina Cry1C que comprende una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO: 3 y variantes de la misma como una proteína que contiene el núcleo de toxina Cry1Fa1 que comprende una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO: 4 y variantes de la misma o una proteína que comprende el núcleo de toxina Cry1Fa2 que comprende una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO: 5 y variantes de la misma, en la que las variantes comprenden una secuencia aminoacídica que tiene más de un 90 % de homología de secuencia aminoacídica con la secuencia aminoacídica según las SEQ ID NO: 2, 3, 4 y 5, respectivamente, y que tienen la misma actividad insecticida que las proteínas respectivas.
5. Una composición de la reivindicación 4 que comprende un hospedador transformado para expresar tanto una proteína que contiene el núcleo de toxina Cry1Ab, una proteína que contiene el núcleo de toxina Cry1C, como una proteína que contiene el núcleo de toxina Cry1Fa1 o Cry1Fa2, en la que dicho hospedador es un microorganismo o una célula vegetal.
6. Un método de control de plagas de lepidópteros que comprende presentar a dichas plagas o al ambiente de dichas plagas una cantidad eficaz de una composición de la reivindicación 4.
7. Una planta de la reivindicación 1, en la que dicha planta se selecciona del grupo consistente en maíz, judías de soja, caña de azúcar y algodón.
8. Una planta de la reivindicación 1, en la que dicha planta es una planta de maíz.
9. Una célula vegetal o una planta de cualquiera de las reivindicaciones 1, 7 y 8, en la que dicha célula vegetal comprende dicho ADN que codifica dicha proteína insecticida Cry1C, dicho ADN que codifica dicha proteína insecticida Cry1Ab y dicho ADN que codifica una proteína insecticida Cry1Fa1 y dicho ADN que codifica dicha proteína insecticida Cry1Fa2, en la que dicha proteína insecticida Cry1C es al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2, dicha proteína insecticida Cry1Ab es al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 3, dicha proteína insecticida Cry1Fa1 es al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4 y dicha proteína insecticida Cry1Fa2 es al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 5.
10. Una planta de cualquiera de las reivindicaciones 1, 7, 8 y 9, en la que dicha proteína insecticida Cry1C comprende la SEQ ID NO: 2, dicha proteína insecticida Cry1Ab comprende la SEQ ID NO: 3 y dicha proteína insecticida Cry1Fa comprende la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 5.
11. Uso de un ADN que codifica una proteína insecticida Cry1C y un ADN que codifica una proteína insecticida Cry1Ab en una planta para controlar el barrenador de caña de azúcar o el cogollero del maíz.
12. Uso de una composición que comprende células que expresan cantidades eficaces tanto de una proteína que contiene el núcleo de toxina Cry1Ab como una proteína que contiene el núcleo de toxina Cry1C para controlar el barrenador de caña de azúcar o el cogollero del maíz.

13. Uso de un método que comprende presentar a un barrenador de caña de azúcar o cogollero del maíz, o al ambiente de dichas plagas, una cantidad eficaz de una composición que comprende células que expresan tanto una proteína que contiene un núcleo de toxina Cry1Ab como una proteína que contiene un núcleo de toxina Cry1C para controlar el barrenador de caña de azúcar o cogollero del maíz.

5

Figura 1- Competición por la unión a BBMV de *Spodoptera frugiperda* por núcleo de toxina Cry1Ab y proteína de núcleo de toxina Cry1Ca marcada con ^{125}I

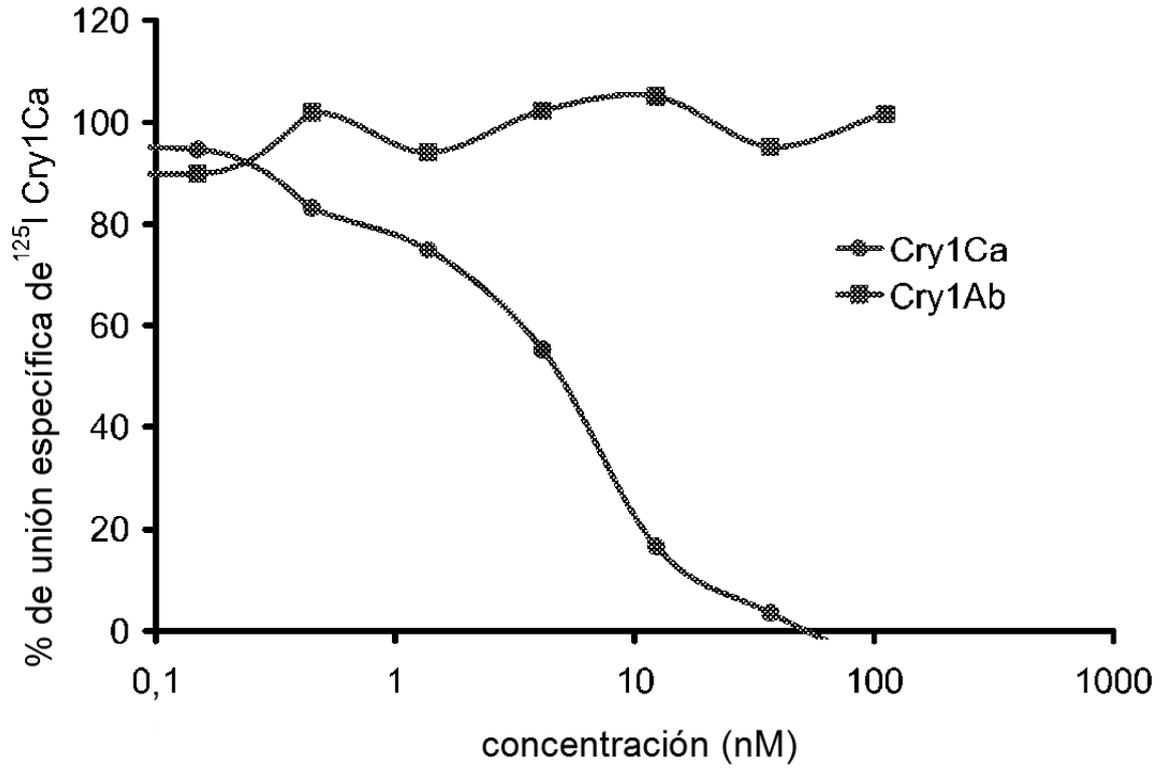


Figura 2- Competición por la unión a BBMV de *Spodoptera frugiperda* de núcleo de toxina Cry1Ca, núcleo de toxina Cry1Ab y proteína de núcleo de toxina Cry1Ab marcada con ^{125}I

