

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 324**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A01N 37/46 (2006.01)
A01N 43/50 (2006.01)
A01H 5/00 (2008.01)
C07K 14/42 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01N 63/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2012 PCT/GB2012/000287**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012 WO12131302**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2012 E 12713248 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2691414**

54 Título: **Plaguicidas**

30 Prioridad:

31.03.2011 GB 201105418

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

28.06.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF DURHAM (50.0%)
University Office Old Elvet
Durham DH1 3HP, GB y
THE SECRETARY OF STATE FOR
ENVIRONMENT, FOOD AND RURAL AFFAIRS
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**GATEHOUSE, JOHN A. y
FITCHES, ELAINE C**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 674 324 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

Plaguicidas

5 La presente invención se refiere al desarrollo de proteínas de fusión a base de toxinas peptídicas como plaguicidas. La invención se refiere asimismo a plantas transgénicas que codifican dichos péptidos y a su utilidad en la gestión de plagas.

10 De cara a un panorama de aumento de la población mundial, la presión sobre los sistemas de producción de alimentos para que sean más eficientes es cada vez mayor. Las plagas siguen siendo una importante limitación en la producción de cultivos a pesar de los avances en las medidas de protección de cultivos y el desarrollo de resistencia del huésped. Las estimaciones sobre las posibles pérdidas a nivel mundial de los seis cultivos principales varían entre el 25 y el 80 % (el 40 % para la patata). Algunas plagas y enfermedades pueden controlarse por aplicación de agroquímicos y prácticas de gestión de cultivos cuidadosas, incluyendo el despliegue de variedades de cultivos resistentes. Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de desarrollar nuevos sistemas de control de plagas eficaces.

20 En el pasado, gran parte de la investigación para el desarrollo de plaguicidas se centraba en la identificación de nuevas entidades químicas que se pudieran utilizar para dichos fines. Sin embargo, en los últimos años, existe una tendencia cada vez mayor a identificar nuevos tipos de "bioplaguicidas" que se puedan utilizar para la gestión de plagas. Los bioplaguicidas se consideran por lo general sustancias naturales (plaguicidas bioquímicos) que controlan las plagas, microorganismos que controlan las plagas (plaguicidas microbianos) y sustancias plaguicidas producidas por plantas que contienen material genético añadido: protectores incorporados en las plantas. Los plaguicidas convencionales, en cambio, son generalmente materiales sintéticos que eliminan o inactivan directamente las plagas. Los beneficios percibidos de los bioplaguicidas incluyen: ausencia de residuos dañinos; menor impacto en las especies que no son diana y, a largo plazo, pueden resultar más económicos y más eficaces que los plaguicidas químicos. Conviene subrayar que ha existido recientemente un impulso legislativo hacia el desarrollo de plaguicidas no químicos.

30 Un buen ejemplo de un bioplaguicida conocido es la toxina Bt, que funciona como insecticida. Se han desarrollado plantas de maíz y algodón transgénicas que sintetizan la toxina Bt proporcionando así una defensa de la planta contra plagas de insectos.

35 En la patente estadounidense US 7.196.057 se explican varias proteínas de fusión para su uso en el control de insectos, en particular, *Manduca sexta* alostatina (Manse-AS) fusionada con lectina de galanto (GNA).

Fitches et al (J. Insect Physiol., Vol. 50, 2004, p62-71) describe el uso de proteínas de fusión de toxina 1 de *Segestria floerntina* (SF11) con GNA.

40 Las toxinas de neuropéptido sintetizadas como veneno por las arañas y otros artrópodos han sido objeto de investigación para el desarrollo de bioplaguicidas. En los documentos WO2006/052806, WO2005/025312 y US2007/0066529 se describe el uso de péptidos de veneno de toxina de araña para su uso en un bioplaguicida y Khan, S. A., et al., (Transgenic Research., Vol. 15, 2006, p349-357) han descrito la expresión de toxina de veneno de araña en plantas para proteger plantas frente al ataque de insectos. Los autores de la presente invención, por tanto, han decidido investigar la utilidad de otras toxinas de araña como plaguicidas. Han observado de manera sorprendente que ω -ACTX-Hv1a, una toxina derivada de la araña *Hadroncyhe versuta* de telaraña en forma de embudo, cuando se fusiona con una proteína de mediar la translocación de la proteína de fusión desde el intestino del invertebrado, puede funcionar como un eficaz plaguicida contra un amplio abanico de plagas.

50 Por consiguiente, un primer aspecto de la invención proporciona una proteína de fusión que comprende: (i) una toxina proteica ω -ACTX-Hv1a que comprende la secuencia de aminoácidos SPTCIPSGQPCYNENCCSQSCTFKENENGNTVKRCD (SEQ ID NO:1), o una variante de la misma que retiene sustancialmente la actividad biológica de la toxina proteica ω -ACTX-Hv1a, teniendo dicha variante una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 % de identidad con SEQ ID NO:1; unida operativamente a (ii) una proteína capaz de mediar la translocación de la proteína de fusión desde el intestino del invertebrado, en la que la proteína capaz de mediar la translocación de la proteína de fusión desde el intestino del invertebrado es una lectina vegetal seleccionada entre una cualquiera o más de las siguientes: lectina de galanto (GNA), lectina de ajo *Allium sativum*, lectina de guisante *Pisum sativum* (P-lec), lectina de cacahuete *Arachis hypogaea*, lectina de judía verde (PHA, *Phytohaemagglutinin*).

60 Se proporcionan realizaciones según las reivindicaciones dependientes.

65 La toxina proteica ω -ACTX-Hv1a es conocida en la técnica. Es una toxina aislada de la araña de telaraña en embudo *Hadroncyhe versuta*. La secuencia de aminoácidos de ω -ACTX-Hv1a es conocida, ya que es la secuencia de ácidos nucleicos que codifica ω -ACTX-Hv1a (tal como se presenta más adelante). ω -ACTX-Hv1a es un antagonista del canal del calcio; se ha demostrado anteriormente que ω -ACTX-Hv1a puede bloquear los canales del

calcio de invertebrados, pero no de vertebrados. Esto es un punto importante ya que, en la mayoría de las circunstancias, es claramente deseable el uso de plaguicidas que no tengan actividad contra animales vertebrados, de tal manera que se eviten los efectos adversos sobre seres humanos o animales domesticados.

5 Se ha notificado anteriormente que es posible utilizar ω -ACTX-Hv1a en solitario como plaguicida cuando se aplica tópicamente sobre orugas (véase Khan et al antes identificado). Sin embargo, los autores han notificado la aplicación tópica del péptido en una solución que contiene imidazol, conocida como insecticida por sí misma. Por otra parte, no se ha notificado ninguna otra prueba más de la actividad insecticida del péptido en solitario, y en otras divulgaciones en las que se cubre ω -ACTX-Hv1a solamente se señala la actividad por inyección en los animales invertebrados que constituyen la plaga.

10 Los autores de la invención han decidido seguir investigando si la toxina ω -ACTX-Hv1a puede emplearse como plaguicida contra plagas de invertebrados. Sin embargo, los autores de la invención creen que es improbable que la toxina ω -ACTX-Hv1a pueda absorberse rápidamente a través de la cutícula u otra superficie externa de los animales invertebrados. Por otra parte, es probable que la toxina tienda a degradarse en el entorno. Así pues, los autores de la invención han considerado que es poco probable que las toxinas de la araña, como la toxina ω -ACTX-Hv1a, sean útiles por sí solas como plaguicidas.

15 Teniendo esto en cuenta, los autores de la invención decidieron estudiar cómo era posible aumentar la eficacia de la toxina. Se podrá apreciar que una ruta probable de la toxina a la plaga es tras la ingestión de la toxina cuando se formula dentro de un componente de su dieta. Sin embargo, la toxina ω -ACTX-Hv1a tiene una escasa toxicidad cuando se mantiene en el intestino del invertebrado. Siendo así, se decidió investigar si la toxina ω -ACTX-Hv1a podría tener una mayor actividad plaguicida si se translocalizaba desde el intestino al sistema circulatorio de las plagas de invertebrados.

20 Tal como se puede deducir del presente documento, los autores de la invención fusionaron la toxina peptídica ω -ACTX-Hv1a con un péptido "vehículo" que puede mediar la translocación de la proteína de fusión desde el intestino del invertebrado. Utilizaron la lectina vegetal GNA como ejemplo de dicho péptido vehículo. Anteriormente, se ha demostrado que GNA cruza el epitelio del intestino y se puede utilizar para entregar péptidos "pasajeros" desde el intestino al sistema circulatorio en animales invertebrados.

25 Por consiguiente, se preparó una proteína de fusión que comprendió una toxina peptídica ω -ACTX-Hv1a unida con GNA y se administró a una serie de animales invertebrados que constituyen plaga por inyección directa o al incluirla en la dieta del animal. Se observó que GNA aumentaba enormemente la actividad biológica y, por tanto, que la toxina peptídica ω -ACTX-Hv1a puede ser eficaz como plaguicida para animales invertebrados cuando se suministra de esta forma. Conviene señalar que hasta la presente invención, no se había preparado toxina ω -ACTX-Hv1a como proteína de fusión ligada a una proteína capaz de mediar la translocación de la proteína de fusión desde el intestino de invertebrado.

30 Tal como se utiliza en el presente documento como se explica con mayor detalle más adelante, "plaguicida" en la presente invención hace referencia a animales invertebrados que constituyen una plaga, incluyendo insectos, moluscos y nematodos.

35 La forma procesada de la toxina ω -ACTX-Hv1a utilizada en la proteína de fusión de un primer aspecto de la invención comprende 37 aminoácidos. Se puede encontrar más información sobre la toxina ω -ACTX-Hv1a en el GenBank; por ejemplo. El Número de acceso P56207 proporciona información acerca de la secuencia de aminoácidos de la forma procesada de toxina ω -ACTX-Hv1a. A continuación se proporciona ejemplo de la secuencia de aminoácidos de toxina ω -ACTX-Hv1a.

40 toxina ω -ACTX-Hv1a (SEQ ID NO: 1)
SPTCIPSGQPCYPNENCCSQSCTFKENENGNTVKRCD

45 Al preparar la proteína de fusión del primer aspecto de la invención, los autores de la invención identificaron que el motivo de aminoácido "KR" hacia el extremo C de la toxina peptídica ω -ACTX-Hv1a era un posible sitio de escisión de señal Kex2. Kex2 es una endoproteasa de levadura. Dado que los autores de la invención concibieron que un medio de preparación de la proteína de fusión de la invención podría ser utilizar un sistema de expresión de *Pichia* o levadura, decidieron preparar una forma modificada de ω -ACTX-Hv1a que tuviera una alteración K34, utilizando la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO:1. Tal como se puede observar por los ejemplos adjuntos, la proteína de fusión con un péptido modificado K34Q ω -ACTX-Hv1a tuvo como resultado un aumento de la proporción de proteína de fusión intacta recuperada del sistema de expresión de célula hospedadora de levadura *Pichia*.

50 Por consiguiente, una realización preferente de la invención es aquella en la que el aminoácido K34 de la proteína ω -ACTX-Hv1a está sustituido. Se entiende por "sustituido" que el resto aminoácido lisina en esta posición está reemplazado por otro aminoácido; preferentemente la Lisina está sustituida por Glutamina (sustitución de K34Q de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1). A continuación, se presenta la secuencia de aminoácidos de la proteína ω -ACTX-Hv1a K34Q modificada en SEQ ID NO: 2

Toxina ω -ACTX-Hv1a modificada (SEQ ID NO: 2)
 SPTCIPSGQPCPYNENCCSQSCTFKENENGNTVQRCD

5 A continuación, se proporciona un ejemplo de secuencia de ácidos nucleicos que codifica la toxina peptídica ω -ACTX-Hv1a modificada en relación con un aspecto más de la invención.

10 Los autores de la invención entienden por "fragmento o variante" de ω -ACTX-Hv1a que la proteína de fusión del primer aspecto de la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos de ω -ACTX-Hv1a que puede variar de la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 1 o 2 siempre y cuando el fragmento o variante retenga sustancialmente la actividad biológica de la toxina ω -ACTX-Hv1a.

15 Los autores de la invención entienden por "variantes" de un polipéptido inserciones, deleciones y sustituciones, tanto conservadoras como no conservadoras. Esto incluye también los casos en los que la secuencia de péptidos omite varios aminoácidos; preferentemente están suprimidos de la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 1 o 2 menos de 5, 4, o 3 aminoácidos. En particular se incluyen variantes del polipéptido cuando dichos cambios no alteran sustancialmente la actividad de la toxina ω -ACTX-Hv1a. Las personas especializadas sabrán que es posible alterar la secuencia de SEQ ID NO: 1 o 2 sin perder actividad biológica. En particular, los cambios simples o cambios similares con respecto a las propiedades físico químicas de los aminoácidos correspondientes no deberán perturbar la funcionalidad y, por otra parte, se pueden tolerar también deleciones pequeñas dentro de las regiones no funcionales del péptido toxina, que se considerarán por tanto "variantes" para los fines de la presente invención. Las personas especializadas pueden adoptar los procedimientos experimentales descritos en el presente documento para determinar si la "variante" puede seguir funcionando como toxina.

20 Se entiende por "sustituciones conservadoras" combinaciones como Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe, Tyr.

25 Es particularmente preferente que la variante tenga una secuencia de aminoácidos que tenga al menos 80 %, incluso aún más preferentemente al menos 85 %, con mayor preferencia aún, al menos 90% siendo sobre todo preferente al menos 95 % o 97 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la toxina ω -ACTX-Hv1a proporcionada en el presente documento.

30 El porcentaje de identidad de secuencia entre dos polipéptidos puede determinarse utilizando programas informáticos adecuados, por ejemplo el programa GAP del Genetic Computing Group de la Universidad de Wisconsin y se podrá apreciar que el porcentaje de identidad se calcula en relación con los polipéptidos cuya secuencia ha sido alineada óptimamente.

35 Existen asimismo homólogos naturales de la toxina peptídica ω -ACTX-Hv1a que se pueden utilizar en el primer aspecto de la invención. Dichos homólogos se consideran "variantes" tal como se ha definido.

40 *Hadroncyhe versuta* produce también las toxinas ω -hexatoxina-Hv1e, ω -hexatoxina-Hv1c, ω -hexatoxina-Hv1d y ω -hexatoxina-Hv1b que tienen cada una de ellas un alto nivel de identidad de secuencia (únicamente unas pocas sustituciones o deleciones de aminoácido). La araña de telaraña en embudo de Sidney (*Atrax robustus*) produce la toxina peptídica ω -hexatoxina-Ar1d que tiene secuencia de aminoácidos idéntica a ω -ACTX-Hv1a y ω -hexatoxina-Ar1h y ω -hexatoxina-Ar1f que tienen un muy alto nivel de identidad de secuencia (solamente unas pocas sustituciones o deleciones de aminoácido).

45 Otras toxinas de péptido más son las producidas por la araña de telaraña en embudo Toowoomba, *Hadronyche infensa* (ω -hexatoxina-Hi1b serie _10, _8, _5, _2, _1; ω -hexatoxina-Hi1d; ω -hexatoxina-Hi1e; ω -hexatoxina-Hi1f) y la araña de telaraña en embudo de Tasmania, *Hadronyche venenata* (ω -hexatoxina-Hvn1b serie _6, _4, _3, _2, _1) y la araña de telaraña en embudo arborícola o del norte *Hadronyche formidabilis* (ω -hexatoxina-Hf1a). Las toxinas peptídicas enumeradas tienen solamente unas pocas sustituciones o deleciones de aminoácido en la secuencia de aminoácidos para la toxina peptídica ACTX-Hv1a de SEQ ID NO: 1 o 2. Por lo tanto, cada una de estas toxinas peptídicas se considera como péptidos homólogos de la toxina peptídica ω -ACTX-Hv1a de SEQ ID NO: 1 o 2 y por tanto pueden utilizarse en el péptido de fusión del primer aspecto de la invención y son realizaciones de dicho aspecto de la invención.

50 Más información concerniente a las toxinas peptídicas homologas se puede encontrar en la base de datos GenBank. La base de datos ArachnoServer puede resultar útil también (www.arachnoserver.org) ya que incluye información sobre un gran número de toxinas de araña, ordenadas por tipos y especies de toxinas. A partir de la información proporcionada en las bases de datos mencionadas y aplicando la búsqueda BLAST perfectamente conocida, las personas especializadas podrán identificar fácilmente otras toxinas peptídicas adicionales que se pueden utilizar.

55 Sin embargo, preferentemente la toxina peptídica que se utilice en el péptido de fusión del primer aspecto de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2; más preferentemente, la toxina peptídica consiste en dicha secuencia.

Preferentemente, las porciones primera y segunda de la proteína de fusión están ligadas por medios genéticos o bioquímicos y, siendo así, en primer el primer caso, por al menos un péptido de unión o, en el segundo caso, por un enlace o enlaces covalentes o no covalentes u otras fracciones de unión. Cuando se utiliza un péptido para unir dichos elementos entre sí, el número de restos de aminoácido en el péptido es variable y se determina según la distancia entre los extremos correspondientes de cada elemento necesario para permitir que dicha proteína de fusión esté en una conformación biológicamente activa. Las porciones del péptido de fusión pueden unirse reversiblemente por medios adaptados para disociar y liberar el agente tóxico *in situ* en un intestino de invertebrado, por ejemplo, siendo metabolizado por un insecto o se puede unir irreversiblemente, dependiendo de la forma del agente tóxico.

La proteína de fusión del primer aspecto de la invención comprende como segunda porción una proteína capaz de mediar la translocación de la proteína de fusión desde el intestino del invertebrado, en la que la proteína capaz de mediar translocación de la proteína de fusión desde el intestino del invertebrado es una lectina vegetal seleccionada entre una cualquiera o más de las siguientes: lectina de galanto (GNA), lectina de ajo *Allium sativum*, lectina de guisante *Pisum sativum* (P-lec), lectina de cacahuete *Arachis hypogaea*, lectina de judía verde (PHA, *Phytohaemagglutinin*).

Los autores de la invención han demostrado anteriormente que ciertas lectinas vegetales son resistentes a la proteólisis del intestino y que tienen el potencial de actuar como vehículos para suministrar otros péptidos desde el intestino al sistema circulatorio de las especies diana. Partiendo de este hallazgo, han utilizado previamente lectinas vegetales como porción de una proteína de fusión que puede mediar la translocación de proteína de fusión desde el intestino del invertebrado.

Por tanto, la segunda porción de la proteína de fusión favorece el paso del elemento tóxico a través del intestino de invertebrado dando cabida a que la proteína se desplace al sitio de toxicidad en el animal invertebrado. La segunda porción se puede considerar como una fracción de translocación que es capaz de actuar como vehículo para translocalizar la primera porción a través de las paredes del intestino del animal invertebrado. Siendo así, la proteína de fusión se puede utilizar como plaguicida para suministrar una toxina al sitio de toxicidad en el animal invertebrado que constituye la plaga.

Entre las proteínas adecuadas capaces de mediar la translocación de la proteína de fusión desde el intestino del invertebrado se incluye lectinas vegetales. Entre las lectinas vegetales para su uso en el péptido de fusión se incluyen una cualquiera o más de las siguientes lectinas vegetales: lectina de galanto *Galanthus nivalis* aglutinina (GNA), lectina de ajo *Allium sativum*, lectina de guisante *Pisum sativum* (P-lec), lectina de cacahuete *Arachis hypogaea*, lectina de judía verde (PHA, *Phytohaemagglutinin*).

La proteína capaz de mediar translocación de la proteína de fusión desde el intestino del invertebrado es una lectina vegetal seleccionada entre una cualquiera o más de las siguientes: lectina de galanto (GNA), lectina de ajo *Allium sativum*, lectina de guisante *Pisum sativum* (P-lec), lectina de cacahuete *Arachis hypogaea*, lectina de judía verde (PHA, *Phytohaemagglutinin*).

Se describe también un "fragmento o variante" de la lectina vegetal, según lo cual se entiende que la secuencia de aminoácidos de la proteína lectina en particular puede diferir de la conocida en la especialidad y la que se da de manera natural, siempre y cuando el fragmento o variante retenga sustancialmente la actividad biológica de la lectina, es decir, que sea capaz de mediar la translocación de la proteína de fusión desde el intestino del invertebrado.

Preferentemente, la lectina es GNA. Los autores de la invención han demostrado en los ejemplos adjuntos que GNA puede mediar la translocación de la proteína de fusión desde el intestino del invertebrado al sitio de toxicidad en el animal. Por tanto, se puede utilizar una proteína de fusión del primer aspecto de la invención que comprende una toxina proteica ω -ACTX-Hv1a, o un fragmento, variante o derivado de la misma, unida operativamente a GNA como plaguicida contra animales invertebrados que constituyen una plaga. A continuación, se proporciona un ejemplo de la secuencia de aminoácidos de GNA (restos de aminoácido 1-105 del polipéptido maduro; de la base de datos de secuencia entrada M55556).

Lectina GNA (SEQ ID NO: 3)

DNILYSGETLSTGEFLNYGSFVIMQEDCNLVLYDVKPIWATNTGGLSRSCFLSMQT
 DGNLVVYNPSNKPIWASNTGGQNGNYVCILQKDRNVVIYGTDRWATG

Una realización del primer aspecto de la invención es aquel en el que la proteína comprende además una etiqueta de afinidad para favorecer la purificación.

El uso de secuencias de etiqueta de aminoácidos cortas para favorecer la purificación de afinidad de proteínas recombinantes es muy conocido dentro de la técnica. De hecho, muchas construcciones de expresión de proteína

disponibles en el mercado incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican dichas etiquetas. Se inserta la proteína de interés en la construcción de expresión de tal manera que la etiqueta de afinidad se une a dicha proteína. Dentro de la técnica, se conocen diversas etiquetas de afinidad, entre las que se incluyen la proteína de unión de quitina (CBP), proteína de unión de maltosa (MBP), glutatona-S-transferasa (GST) y etiqueta His.

Una etiqueta polihistidina es un motivo de aminoácido en proteínas que consiste en al menos cinco restos histidina (His), a menudo en el extremo N- o C- de la proteína. Se conoce como etiqueta hexa histidina, 6xHis-tag y por el nombre comercial His-tag®. Son etiquetas de afinidad muy conocidas y, dentro de la técnica se conocen métodos para introducir etiquetas His en proteínas recombinantes, ya que son métodos de rutina para purificar proteínas con etiquetas His. Una realización preferente de la invención es aquella en la que la etiqueta de afinidad es una etiqueta His.

Las personas especializadas en la técnica podrán apreciar que la proteína de fusión de la invención puede prepararse para que la segunda porción, que es preferentemente péptido GNA, esté situada en el extremo N de la toxina proteica ω-ACTX-Hv1a. Por tanto, dicho péptido de fusión tiene la disposición: NH₂-(GNA: ω-ACTX-Hv1a)-COOH. De hecho, los autores de la invención han preparado varios péptidos de fusión y son realizaciones específicas de la invención.

NH₂-GNA: ω-ACTX-Hv1a)-COOH (SEQ ID NO: 4)

DNILYSGETLSTGEFLNYGSFVIMQEDCNLVLYDVKPIWATNTGGLSRSCFLSMQT
 DGNLVVYNPSNKPIWASNTGGQNGNYVCILQKDRNVVIYGTDRWATGAAASPTCIPS
 GQPCPYNENCCSQSCTFKENENGNTVKRCDVDHHHHHH.

El péptido de SEQ ID NO: 4 tiene una etiqueta HIS de seis aminoácidos situada en el extremo C. Dicha etiqueta HIS se puede utilizar para favorecer la recuperación del péptido de fusión cuando se separa como parte de un sistema de expresión de proteína recombinante. Sin embargo, la presencia de etiqueta HIS es opcional y, por tanto, una variante de SEQ ID NO: 4 puede incluir la secuencia de péptido sin la etiqueta HIS.

NH₂-(GNA: ω-ACTX-Hv1a MODIFICADA)-COOH (SEQ ID NO: 5)

HHHHHHDNILYSGETLSTGEFLNYGSFVIMQEDCNLVLYDVKPIWATNTGGLSRSC
 FLSMQTDGNLVVYNPSNKPIWASNTGGQNGNYVCILQKDRNVVIYGTDRWATGAAA
 SPTCIPSGQPCPYNENCCSQSCTFKENENGNTVQRCD

En esta realización, se sitúa la etiqueta HIS en el extremo N-. De manera similar a SEQ ID NO: 4, la etiqueta HIS es opcional y por tanto una variante de SEQ ID NO: 5 puede incluir dicha secuencia de péptido sin la etiqueta HIS.

Asimismo, la SEQ ID NO: 5 incluye la secuencia de aminoácidos de ω-ACTX-Hv1a modificada, es decir, con una sustitución de K34Q tal como se ha explicado y tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 2. Tal como se ha mencionado, la proteína de fusión con un péptido K34Q ω-ACTX-Hv1a modificado tiene como resultado un aumento de la proporción de proteína de fusión intacta recuperada del sistema de expresión de célula hospedadora de levadura *Pichia*.

Al preparar la proteína de fusión de la invención, los autores de la invención decidieron investigar si la disposición de las porciones primera y segunda en la proteína de fusión de la invención afectaba a la actividad plaguicida de la proteína.

Sorprendentemente, observaron que para algunas plagas, sobre todo para larvas de *Mamestra brassicae* y *Leptinotarsa decemlineata*, la localización de ω-ACTX-Hv1a en el extremo N en relación con GNA proporcionaba un beneficio inesperado: las proteínas de fusión que tienen dicha disposición tienen un efecto plaguicida mucho mayor. Hasta ahora no se había identificado la importancia para la actividad plaguicida del orden de una toxina en relación con la lectina en una proteína de fusión plaguicida. Por lo tanto, la disposición es una realización preferente de la invención y presenta una clara y sorprendente ventaja.

Por lo tanto, una realización preferente de la invención es aquella en la que el péptido GNA está localizado en el extremo C de la toxina proteica ω-ACTX-Hv1a. Dicho péptido de fusión tiene la disposición: NH₂-(ω-ACTX-Hv1a: GNA)-COOH.

También en este caso, los autores de la invención prepararon varios de estos péptidos de fusión, que son realizaciones de la invención específicas.

NH₂-(ω -ACTX-Hv1a : GNA)-COOH (SEQ ID NO: 6)

ASPTCIPSGQPCPYNENCCSQSCTFKENENGNTVKRCDAAADNILYSGETLSTGEFL
 NYGSFVIMQEDCNLVLYDVKPIWATNTGGLSRSCFLSMQTDGNLVVYNPSNKPIW
 ASNTGGQNGNYVCILQKDRNVVIYGTDRWATG.

5 NH₂-(ω -ACTX-Hv1a : GNA : HIS)-COOH (SEQ ID NO: 7)

ASPTCIPSGQPCPYNENCCSQSCTFKENENGNTVKRCDAAADNILYSGETLSTGEFL
 NYGSFVIMQEDCNLVLYDVKPIWATNTGGLSRSCFLSMQTDGNLVVYNPSNKPIW
 ASNTGGQNGNYVCILQKDRNVVIYGTDRWATGVDHHHHHH.

10 En esta realización la etiqueta HIS está situada en el extremo C. De manera similar a la SEQ ID NO: 4, la etiqueta HIS es opcional.

NH₂-(ω -ACTX-Hv1a MODIFICADA: GNA)-COOH (SEQ ID NO: 8)

ASPTCIPSGQPCPYNENCCSQSCTFKENENGNTVQRCDAAADNILYSGETLSTGEFL
 NYGSFVIMQEDCNLVLYDVKPIWATNTGGLSRSCFLSMQTDGNLVVYNPSNKPIW
 ASNTGGQNGNYVCILQKDRNVVIYGTDRWATG.

15 Asimismo, la SEQ ID NO: 8 incluye la secuencia de aminoácidos modificada de ω -ACTX-Hv1a, es decir, con una sustitución de K34Q tal como se ha explicado y tal como se proporciona en SEQ ID NO: 2. Tal como se ha mencionado, la proteína de fusión con un péptido K34Q ω -ACTX-Hv1a modificado tiene como resultado un aumento de la proporción de proteína de fusión intacta recuperada del sistema de expresión de célula hospedadora de levadura *Pichia*.

NH₂-(ω -ACTX-Hv1a MODIFICADA: GNA : HIS)-COOH (SEQ ID NO: 9)

ASPTCIPSGQPCPYNENCCSQSCTFKENENGNTVQRCDAAADNILYSGETLSTGEFL
 NYGSFVIMQEDCNLVLYDVKPIWATNTGGLSRSCFLSMQTDGNLVVYNPSNKPIW
 ASNTGGQNGNYVCILQKDRNVVIYGTDRWATGHHHHHH.

25 En esta realización la etiqueta HIS está situada en el extremo C.

30 El péptido de fusión ω -ACTX-Hv1a MODIFICADO: GNA: HIS presentado en SEQ ID NO: 9 es una realización de la invención particularmente preferente. En este péptido, está modificado el péptido ω -ACTX-Hv1a con la sustitución de K34Q, tal como se ha explicado, y por tanto, se puede recuperar más proteína de fusión intacta del sistema de expresión de célula hospedadora de levadura *Pichia*. Por otra parte el péptido de fusión de SEQ ID NO: 9 incluye una etiqueta HIS, favoreciendo así la recuperación del péptido de fusión desde el sistema de expresión. Por otra parte, la localización de ω -ACTX-Hv1a en el extremo N en relación con GNA proporciona los beneficios señalados de un mayor efecto plaguicida.

35 Al preparar el péptido de fusión ω -ACTX-Hv1a MODIFICADA: GNA: HIS del primer aspecto de la invención, los autores de la invención decidieron incluir también un péptido señal en el péptido de fusión. Dicho péptido señal puede dirigir la secreción del péptido de fusión desde una célula de levadura, de tal manera que favorezca la recuperación de la proteína de fusión cuando se expresa en un sistema de expresión de levadura.

40 Si bien se conoce una serie de péptidos de señal diferentes, los autores de la invención decidieron utilizar la secuencia señal factor α , un péptido de secreción de levadura habitualmente utilizado.

45 Por lo tanto, una realización de la invención específica y preferente es aquella en la que el péptido de fusión ω -ACTX-Hv1a MODIFICADA: GNA: HIS (p.ej. tal como se muestra en SEQ ID NO: 9) comprende además una secuencia señal de factor α N-terminal. A continuación, se ofrece un ejemplo de dicho péptido:

Un péptido señal α fusionado con NH₂-(ω -ACTX-Hv1a MODIFICADA: GNA : HIS)-COOH (SEQ ID NO: 10)

MRFPSLLLLLVLF AASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVL PFSNSTNNGLLFINTTI
ASIAAKEEGVSL EKREAEAAAASPTCIPSGQPCPYNENCCSQSCTFKENENGNTVQRCDAAADN ILYSGET
LSTGEFLNYGSFV FIMQEDCNLVLYDVKPIWATNTGGLSRSCFLSMQTDGNLVVYNP SNKPIWASNTGG
QNGNYVCILQKDRNVVIYGTDRWATGVDHHHHHHSR

5 La proteína de fusión del primer aspecto de la invención puede presentarse como una preparación sustancialmente purificada. Se entiende por "purificada" que la proteína de fusión se ha separado al menos parcialmente de otros componentes en cuya presencia se ha formado, por ejemplo, otros componentes de una célula recombinante. Más adelante, se describen ejemplos de métodos de purificación que se pueden utilizar.

10 La preparación puede ser sustancialmente pura. Se entiende por "sustancialmente pura" que dicha proteína de fusión está sustancialmente desprovista de otras proteínas. Por lo tanto, se incluye cualquier composición que incluya al menos 30 % en peso del contenido de proteína como dicha proteína de fusión, preferentemente al menos 50 %, más preferentemente al menos 70 %, siendo aún más preferente al menos 90 % siendo sobre todo preferente al menos 95 % del contenido de proteína es dicha proteína de fusión.

15 Por lo tanto, la invención incluye también composiciones que comprenden dicha proteína de fusión y un contaminante, en la que el contaminante comprende menos de 70 % en peso de la composición, preferentemente menos de 50 % de la composición, más preferentemente menos de 30 % de la composición, aún más preferentemente menos de 10 % de la composición siendo sobre todo preferente menos de 5 % en peso de la composición.

20 La invención incluye asimismo dicha proteína fusión sustancialmente pura cuando se combina con otros componentes *ex vivo*, no siendo dichos otros componentes todos los componentes que se encuentran en la célula en la que se encuentran dichos polipéptidos.

25 Tal como se ha explicado, los autores de la invención han determinado que el péptido de fusión del primer aspecto de la invención se puede utilizar como plaguicida.

30 Un plaguicida puede ser una sustancia química, un agente biológico (como, por ejemplo, un virus o una bacteria), un antimicrobiano, un desinfectante o un dispositivo utilizado contra cualquier plaga. Las plagas incluyen insectos, patógenos de las plantas, malas hierbas, moluscos, aves, mamíferos, peces, nematodos (ascáridos) y microbios que destruyen terrenos, extienden enfermedades o que son vector de enfermedades o que causan trastornos

35 Sin embargo, para la presente invención, se entiende por "plaguicida" que la plaga es cualquier animal invertebrado que destruye terrenos, en particular fincas agrícolas.

40 Más preferentemente aún, la proteína de fusión es capaz de destruir, o al menos inactivar plagas de insectos de los siguientes órdenes: Coleópteros p.ej., doradilla (*Diabrotica undecimpunctata*); gorgojo de la judía (*Callosobruchus maculatus*); Lepidópteros, p.ej., barrenador del maíz europeo (*Ostinia nubilalis*); polilla del cuerno del tabaco (*Manduca sexta*); barrenador del tallo (*Chilo partellus*); plagas de Homópteros p.ej. saltamontes pardo del arroz (*Nilaparvata lugens*); saltamontes de las hojas verdes del arroz (*Nephotettix cinciteps*); saltamontes de la patata (*Empoasca fabae*); pulgón verde del melocotonero (*Myzus persicae*); pulgón del guisante (*Acyrtosiphon pisum*); Dípteros, p.ej., mosca amarilla de las cañas (*Chlorop pumilionis*); Ortópteros, p.ej., grillos y langostas; Isópteros, p.ej., termitas; Tisanópteros, p.ej. trips; Himenópteros, p.ej., plagas de hormigas y artrópodos del orden de los Acarina (ácaros).

45 Entre las plagas preferentes se incluyen el Lepidóptero *Mamestra brassicae*, escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*, un Coleóptero), mosca de bombilla del trigo (*Delia coarctata*, un Antómiido) y el pulgón del cereal *Sitobion avenae*, un Homóptero.

50 Los autores de la invención han investigado asimismo, si la proteína de fusión del primer aspecto de la invención tiene actividad plaguicida contra moluscos. Según se demuestra en los ejemplos adjuntos, han observado de manera sorprendente que la babosa gris grande (*Decoceras reticulatum*, un molusco) es susceptible de la actividad plaguicida de la proteína de fusión. Por consiguiente, la proteína de fusión es capaz de destruir, o al menos deshabilitar moluscos, incluyendo babosas y caracoles, en particular, la babosa gris grande.

55 La proteína de fusión del primer aspecto de la invención puede tener asimismo actividad plaguicida contra nematodos, en particular, nematodos parásitos/patógenos, como *Globodera* spp., nematodos formadores de agallas *Meloidogyne* spp., o nematodos formadores de quistes *Heterodera* spp.

“Actividad plaguicida” de una proteína de fusión, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la actividad de la proteína para eliminar, causar enfermedad, inhibir el crecimiento o afectar negativamente de otra forma a todo o parte de un organismo que constituye una plaga.

5 Puede apreciarse que la proteína de fusión del primer aspecto de la invención se puede preparar aplicando una serie de técnicas de laboratorio diferentes.

Por ejemplo, se puede sintetizar el péptido de fusión aplicando síntesis de péptido en fase sólida, como por ejemplo técnicas Fmoc o Boc.

10 Sin embargo, preferentemente, la proteína de fusión del primer aspecto de la invención se prepara aplicando técnicas de expresión de proteína recombinante en células hospedadoras apropiadas. En el presente documento, se proporciona una explicación de dichos métodos.

15 Un segundo aspecto de la invención proporciona una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención.

Al preparar la proteína de fusión del primer aspecto de la invención, los autores de la invención decidieron optimizar los codones que codifican la toxina peptídica ω -ACTX-Hv1a para su expresión en un sistema de expresión de célula de levadura. A continuación se presenta dicha secuencia de ácidos nucleicos:

Secuencia de ácidos nucleicos que codifica toxina ω -ACTX-Hv1a modificada (SEQ ID NO: 11)

TCTCCAACCTT GTATTCCATC TGGTCAACCA TGTCATATA ATGAAAATTG TTGTCTCAA
TCTTGTACTT TTAAAGAAAA TGAAAATGGT AATACTGTTC AAAGATGTGA T

25

A continuación se presenta un ejemplo de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el péptido de lectina GNA:

Péptido GNA (SEQ ID NO: 12)

30

GACAATATTT TGTACTCCGG TGAGACTCTC TCTACAGGGG AATTTCTCAA CTACGGAAGT 60
TTCGTTTTTA TCATGCAAGA GGACTGCAAT CTGGTCTTGT ACGACGTGGA CAAGCCAATC 120
TGGGCAACAA ACACAGGTGG TCTCTCCCGT AGCTGCTTCC TCAGCATGCA GACTGATGGG 180
AACCTCGTGG TGTACAACCC ATCGAACAAA CCGATTTGGG CAAGCAACAC TGGAGGCCAA 240
AATGGGAATT ACGTGTGCAT CCTACAGAAG GATAGGAATG TTGTGATCTA CGGAAGTATG 300
CGTTGGGCCA CTGG

A continuación se proporciona un ejemplo de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido señal α fusionado con NH_2 - (ω -ACTX-Hv1a MODIFICADO: GNA : HIS)-COOH (tal como se muestra en SEQ ID NO: 10):

35

Péptido señal α fusionado con NH_2 - (ω -ACTX-Hv1a MODIFICADO: GNA : HIS)-COOH (SEQ ID NO:13)

ATGAGATTTCTTCATTTTTACTGCTGGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACA
CTACAACAGAAGATGAAACGGCACAATTCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGA
TTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTTATAAATACTACTATT
GCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGCAGCATCTCCAA
CTTGTATTCCATCTGGTCAACCATGTCCATATAATGAAAATGTTGTTCTCAATCTTGTACTTTTAAAGA
AAATGAAAATGGTAATACTGTTCAAAGATGTGATGCGGCCCGACAATATTTTGTACTCCGGTGAGACT
CTCTCTACAGGGGAATTTCTCAACTACGGAAGTTTCGTTTTTATCATGCAAGAGGACTGCAATCTGGTCT
TGTACGACGTGGACAAGCCAATCTGGGCAACAAACACAGGTGGTCTCTCCCGTAGCTGCTTCTCAGCAT
GCAGACTGATGGGAACCTCGTGGTGTACAACCCATCGAACAAACCGATTTGGGCAAGCAACACTGGAGGC
CAAAATGGGAATTACGTGTGCATCCTACAGAAGGATAGGAATGTTGTGATCTACGGAAGTATCGTTGGG
40 CCACTGGAGTGGACCATCATCATCATCATTGA

Los métodos de preparación de moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión recombinantes

emplean técnicas de biología molecular de rutina.

Se han desarrollado varios métodos para unir polinucleótidos para formar ADN monocatenario o de doble cadena, especialmente de doble cadena, por ejemplo, a través de los términos cohesivos de complementariedad producidos por digestión con enzimas de restricción. En Sambrook et al. (2000) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY se describen métodos adecuados. Las personas especializadas en la técnica pueden recurrir a dichos métodos sin problema para preparar una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el segundo aspecto de la invención. Por otra parte, los ejemplos adjuntos proporcionan detalles sobre cómo preparar dicha molécula, tal como se explica en la sección de los métodos, más adelante.

Una forma deseable de preparar la molécula de ácido nucleico de este aspecto de la presente invención es utilizar la reacción en cadena de la polimerasa. Dicho método puede aplicarse para introducir ADN en un vector adecuado, por ejemplo, por ingeniería genética, en sitios adecuados para digestión de enzimas de restricción, o puede utilizarse para modificar el ADN de otra forma útil, tal como se conoce en la técnica. Por lo tanto, se puede preparar fácilmente la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de fusión del primer aspecto de la invención de acuerdo con la información proporcionada en el presente documento.

Un tercer aspecto de la invención proporciona una construcción de expresión que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del segundo aspecto de la invención.

Una "construcción de expresión" es un extremo conocido en la técnica. Las construcciones de expresión son herramientas básicas para la producción de proteínas recombinantes en biotecnología. La construcción de expresión incluye generalmente un plásmido que se utiliza para introducir una secuencia de ácidos nucleicos específica en una célula diana, una "célula hospedadora". Una vez que la construcción de expresión está dentro de la célula, se produce la proteína que está codificada por ese gen por complejos ribosómicos de maquinaria de traducción y transcripción celular. El plásmido incluye también las secuencias de ácido nucleico requeridas para el mantenimiento y propagación del vector, en algunos casos a través de la integración en el genoma hospedador. La meta del vector de expresión es la producción de grandes cantidades de ARN mensajero estable y, por tanto, proteínas.

Las construcciones de expresión que comprenden ácido nucleico adecuadas para su introducción en microorganismos y organismos superiores pueden seleccionarse o construirse de manera que contengan secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, fragmentos de terminación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias, según sea apropiado. Para más detalles véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2ª edición*, Sambrook et al. *supra*.

El plásmido se suele obtener por ingeniería genética para que contenga secuencias reguladoras que actúan como regiones potenciadoras o promotoras y que conducen a una transcripción eficiente del gen soportado en el gen de expresión. La mayor parte de las unidades reguladoras están situadas en dirección 5' de la secuencia codificante del gen heterólogo y están operativamente unidas a la misma. El casete de expresión puede contener también una región sin traducir en dirección 3' que comprende un sitio de poliadenilación, si se prevé la expresión en un hospedador eucariota. Las secuencias reguladoras pueden dirigir una expresión constitutiva o inducible de la secuencia codificante heteróloga.

Se conocen muchos sistemas de expresión, incluyendo bacterias (por ejemplo *E. coli* y *Bacillus subtilis*), levaduras (por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*), hongos filamentosos (por ejemplo *Aspergillus*), células vegetales, células animales y células de insectos.

En los ejemplos que se adjuntan se divulga un ejemplo de una construcción de expresión de acuerdo con el tercer aspecto de la invención. En este caso, la construcción de expresión estaba situada dentro de un vector de expresión: es decir un plásmido utilizado para introducir un ácido nucleico en una célula hospedadora apropiada y facilitar la expresión de dicho ácido nucleico desde la maquinaria de transcripción y traducción en esa célula. En el ejemplo proporcionado en el presente documento, se insertó la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una realización de la proteína de fusión del primer aspecto de la invención en el vector de expresión de levadura pGAPZαB para crear ω-ACTX-Hv1a MODIFICADA: GNA:HIS- pGAPZαB. El vector de expresión de levadura pGAPZαB está distribuido en el mercado, por ejemplo, por Invitrogen (www.invitrogen.com)

Un cuarto aspecto de la invención proporciona una célula hospedadora que comprende la molécula de ácido nucleico del segundo aspecto de la invención o la construcción de expresión del tercer aspecto de la invención.

La célula hospedadora puede ser procarionota o eucariota. Las células hospedadoras procarionotas preferentes son normalmente cepas de *E. coli* como, por ejemplo las cepas *E. coli* DH5 y RR1. Las células hospedadoras eucariotas preferentes incluyen células de levadura, insecto y mamífero, preferentemente células de vertebrados, como por ejemplo de ratón, rata, mono o líneas celulares fibroblásticas humanas. Entre las células hospedadoras de levadura se incluyen YPH499, YPH500 y YPH501 distribuida por en general por Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, Estados Unidos. Sin embargo, preferentemente, la célula hospedadora es la levadura *Pichia pastoris*. Los sistemas de expresión de proteína de *Pichia* son perfectamente conocidos en la técnica y, por tanto, se pueden

obtener fácilmente células para su uso como células hospedadoras. Es particularmente preferente que la cepa de célula sea SMD1168H, que se puede obtener de Invitrogen™ (www.invitrogen.com).

5 La transformación de las células hospedadoras apropiadas con una construcción de ADN se lleva a cabo a través de métodos muy conocidos que dependen normalmente del tipo de vector utilizado. En lo que se refiere a la transformación de células hospedadoras procariontas, véase, por ejemplo Sambrook *et al supra*. La transformación de células de levadura se describe en Sherman et al (1986) *Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY.

10 La electroporación también es útil para transformar y/o transfectar células y es muy conocida en la técnica para transformar células de levadura, células bacterianas, células de insectos y células de vertebrados. Los métodos para la transformación de levaduras por electroporación se divulgan en Becker & Guarente (1990) *Methods Enzymol.* 194, 182.

15 Las células transformadas con éxito, es decir, las células que contienen una construcción de ADN de la presente invención, se pueden identificar a través de técnicas muy conocidas. Por ejemplo, se pueden cultivar células que son el resultado de la introducción de una construcción de expresión de la presente invención para producir el polipéptido de la invención. Se pueden recoger y lisar las células y examinar su contenido de ADN en cuanto a la presencia del ADN aplicando un método como el descrito por Southern (1975) *J. Mol. Biol.* 98, 503 o Berent et al (1985) *Biotech.* 3, 208.

20 Por lo tanto, además de las propias células hospedadoras transformadas, la presente invención también contempla un cultivo de dichas células, preferentemente, un cultivo monoclonal (clónicamente homogéneo), o un cultivo derivado de un cultivo monoclonal, en un medio nutriente.

25 Un quinto aspecto de la invención proporciona un método de preparación de una proteína de fusión del primer aspecto de la invención que comprende el cultivo de una célula hospedadora, tal como se ha definido en el cuarto aspecto de la invención en condiciones adecuadas para la expresión de la proteína de fusión.

30 Una realización del quinto aspecto de la invención es aquella en la que el método comprende además la etapa de recuperación de la proteína de fusión.

35 El método del quinto aspecto de la invención comprende el cultivo de la célula hospedadora descrita durante un período de tiempo suficiente y en las condiciones apropiadas en un medio de cultivo para obtener la expresión de la proteína de fusión.

40 Los métodos de cultivo de células hospedadoras y aislamiento de proteínas recombinantes son muy conocidos en la técnica. En los ejemplos se ilustran las técnicas de purificación adecuadas. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender una etiqueta de afinidad para favorecer la purificación utilizando reactivos de afinidad, tal como conocerán perfectamente las personas especializadas en la técnica y como se describe en los ejemplos.

45 El polipéptido recombinante del primer aspecto de la invención se puede recuperar y purificar a partir de cultivos de células recombinantes a través de métodos perfectamente conocidos entre los que se incluyen precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía con fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía con hidroxipatita y cromatografía con lectina.

50 Alternativamente, es posible no recuperar el polipéptido del primer aspecto de la invención desde el sobrenadante. En tal caso, se separa la célula hospedadora del sobrenadante por simple centrifugación, tal como podrán apreciar las personas especializadas en la técnica. El sobrenadante recuperado que comprende la proteína de fusión del primer aspecto de la invención puede utilizarse directamente.

55 El polipéptido recombinante se puede aislar fácilmente desde el medio de cultivo utilizando técnicas normales conocidas en la técnica, entre las que se incluyen precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio de aniones o cationes, cromatografía con fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía con hidroxilapatita y cromatografía con lectina.

60 Los ejemplos adjuntos proporcionan detalles del protocolo que se puede utilizar para este método de la invención. En este caso, la célula hospedadora es la levadura *Pichia pastoris*.

65 Se cultivaron células que contenían las secuencias que codifican la proteína de fusión en una fermentadora BioFlo 110. Brevemente, para la fermentación, se utilizaron cultivos 3 x 50 ml de cultivo de YPG para inocular 3 l de medio mínimo estéril suplementado con PTM1. Se continuó el cultivo a 30 °C, oxígeno disuelto al 30 %, pH 4,5 – 5,0 con agitación continua con alimentación de glicerol. Se separaron las proteínas secretadas de las células por centrifugación. A continuación, se purificaron las proteínas recombinantes desde el medio de cultivo por cromatografía de interacción hidrófoba.

Para las proteínas de fusión que contenían etiquetas de histidina, se cargó el sobrenadante de cultivo diluido en columnas Ni-NTA (afinidad de níquel) durante 3-10 horas a temperatura ambiente con ciclación. Después de la carga, se lavaron las columnas con un tampón adecuado y se eluyeron las proteínas de la columna con tampón que contenía imidazol a ≥ 200 mM.

A continuación, se dializaron las fracciones que contenían proteínas purificadas (analizadas por SDS-PAGE) contra agua destilada y se liofilizaron. A continuación, se evaluaron las muestras liofilizadas en cuanto a la pureza y el contenido de proteína de fusión por SDS-electroforesis con gel de poliacrilamida. Se estimaron las concentraciones de las proteínas recombinantes comparando con cantidades conocidas de proteínas patrón por SDS-PAGE.

Un sexto aspecto de la invención proporciona una composición plaguicida que comprende una proteína de fusión de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

Más adelante, se proporcionan los métodos de preparación de una proteína de fusión para su uso en la composición plaguicida de este aspecto de la invención.

Preferentemente, la composición plaguicida está en forma de cualquier formulación deseada, como por ejemplo solución, emulsión, pulverizado, suspensión, polvos, espuma, pasta, granulado, aerosol, cápsula u otro material finamente o gruesamente dividido o agente de impregnación para un material natural o sintético.

En una realización preferente dicha composición plaguicida está en forma de pulverizado, suspensión, o similar, mezclado con diluyentes, adyuvantes, conservantes, dispersantes, disolventes, agentes emulsionantes o similares adecuados. Entre los componentes de composición adecuados se incluyen los empleados convencionalmente en la técnica y, en particular, adecuados para la aplicación de administración oral de la presente invención. La composición puede obtenerse con el uso de cualquier disolvente adecuado, preferentemente, agua, alcohol, aceite mineral, o similar, cualquier vehículo sólido adecuado, como caolín, arcilla, talco, tiza, cuarzo, atapulgita, montmorillonita, tierra de diatomeas, sílice, y similares, con el uso de cualquier vehículo sólido como soporte para granulados, como calcita, mármol, piedra pómez o material de fibra natural triturado o similares.

Las composiciones para su uso en la invención pueden emplearse además mezcladas a fondo o de forma física con otros insecticidas, sustancias para promover o regular el crecimiento, herbicidas, fungicidas, agentes sinérgicos y similares.

La composición es adecuada preferentemente para su asociación física o química con plantas y sus lugares de crecimiento y para que la absorban patógenos.

La composición puede comprender por lo tanto una proteína de fusión, tal como se ha definidos en una cantidad comprendida entre 0,001 % y 99 % en peso, preferentemente entre 0,5 y 98 % en peso, más preferentemente entre 1,0 y 95 % en peso. Tal como se señala en los ejemplos adjuntos, las cantidades concretas del péptido de fusión utilizado como plaguicida se dan en un intervalo de cantidades, en la región de 0,01 %, 0,05 %, 0,75 %, 0,1 % y cantidades comprendidas entre estos intervalos.

La composición plaguicida de este aspecto de la invención puede utilizarse contra plagas de invertebrados, tal como se ha señalado antes en relación con el primer aspecto de la invención. En particular, el plaguicida puede utilizarse contra plagas de insectos, moluscos y nematodos.

Entre los ejemplos de dichas plagas se incluyen Lepidópteros *Mamestra brassicae*, escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*, un Coleóptero), mosca de bombilla del trigo (*Delia coarctata*, un Antómiido (y el pulgón del cereal *Sitobion avenae*, un Homóptero; la babosa gris grande (*Decoceras reticulatum*, un molusco); nematodos parásitos/patógenos de las plantas, como nematodos formadores de agallas *Meloidogyne* spp., o nematodos formadores de quistes *Heterodera* spp.

Se describe asimismo un proceso para la preparación de una composición plaguicida del sexto aspecto de la invención que comprende mezclar una cantidad de una proteína de fusión del primer aspecto de la invención con uno o más vehículos, diluyentes, adyuvantes, conservantes, dispersantes, disolventes, agentes emulsionantes adecuados en una cantidad plaguicida eficaz.

Un séptimo aspecto de la invención proporciona un método de prevención y tratamiento de una infección de plaga de una planta que comprende la aplicación de una cantidad de la proteína de fusión de acuerdo con el primer aspecto de la invención o una composición plaguicida de acuerdo con el sexto aspecto de la invención a la planta o lugar de crecimiento; o la introducción en la planta de la secuencia de ácidos nucleicos del segundo aspecto de la invención.

El término "lugar", tal como se ha utilizado, se refiere a la localización física en la que crece el cultivo o la planta. Por ejemplo, para cultivos agrícolas, el lugar puede ser un campo; para cultivos de verduras, el lugar puede ser un macizo o un huerto; y para plantas ornamentales, el lugar puede ser un tiesto o una jardinera.

Los autores de la presente invención han investigado el uso de la proteína ω -ACTX-Hv1a como toxina contra diferentes especies de plaga. Además de la actividad insecticida de ω -ACTX-Hv1a han demostrado que la toxina se puede utilizar contra moluscos y nematodos.

5 Un aspecto relacionado incluye el uso de una proteína de fusión que comprende una toxina proteica ω -ACTX-Hv1a, o un fragmento o una variante de la misma, como primera porción, unida a una proteína capaz de mediar la translocación de la proteína de fusión desde el intestino de invertebrado como segunda porción.

10 La invención puede estar dirigida al uso de una proteína de fusión que comprende una proteína ω -ACTX-Hv1a como plaguicida contra la infestación de una plaga de moluscos o nematodos en la planta. Es posible controlar un abanico de diferentes plagas de moluscos utilizando la proteína de fusión, en particular babosa gris grande (*Decoceras reticulatum*). Por consiguiente, cuando el molusco es una babosa o un caracol, se incluye y es en particular la babosa gris grande. Entre los ejemplos de plagas de nematodos se incluyen nematodos parásitos/patógenos de la planta como nematodos formadores de agallas *Meloidogyne* spp., o nematodos formadores de quistes *Heterodera* spp.

El péptido de fusión del primer aspecto de la invención y los aspectos relacionados de la invención enumerados, concretamente las composiciones plaguicidas, pueden utilizarse como molusquicidas.

20 Se podrá apreciar que el molusquicida se prepara y se formula convenientemente para que el consumidor lo pueda utilizar fácilmente. Por ejemplo, es posible preparar el molusquicida como líquido que se puede pulverizar sobre un cultivo, o como un granulado que se puede aplicar también sobre los cultivos.

25 Dentro de la técnica se sabe que el molusquicida se presenta habitualmente en forma de cebo (o en microgránulos). Cuando se presenta en dicho formato, el usuario puede aplicar fácilmente el molusquicida a la planta o el lugar de crecimiento y evitar o tratar así la infección de plagas de moluscos.

Por tanto, se proporciona también una composición de cebo molusquicida que comprende una proteína de fusión de acuerdo con el primer aspecto de la invención y/o una composición plaguicida del sexto aspecto de la invención.

30 Los microgránulos o cebo pueden incluir además un atrayente para el molusco para potenciar la exposición de la plaga al molusquicida. Un atrayente para el molusco es cualquier sustancia que resulte atractiva a los moluscos. El atrayente puede ser un fagoestimulante. Los fagoestimulantes se utilizan convencionalmente en las formulaciones de cebos contra babosas y caracoles para atraer a los gasterópodos para que ingieran el molusquicida y normalmente son atrayentes y/o comida. Pueden utilizarse también mezclas de fagoestimulantes con otros vehículos orgánicos y/o inorgánicos adecuados. Entre los fagoestimulantes para molusquicidas adecuados se incluyen cereales molidos (como harina de trigo, harina de cebada, harina de centeno y almidón de arroz), alubias de soja trituradas, harina de pescado, melazas, semillas de colza trituradas, y similares. En la presente invención se pueden utilizar también mezclas de fagoestimulantes. Otros atrayentes conocidos incluyen cerveza, levadura y extracto de babosas muertas. La composición de cebo puede comprender también uno o más repelentes para pájaros, como antraquinona.

45 Puede formularse la composición para proporcionar una liberación lenta o retardada del molusquicida a lo largo del tiempo, para proporcionar protección a largo plazo contra los moluscos. Entre los auxiliares de liberación lenta adecuados que se pueden emplear en la formulación se incluyen por ejemplo resinas (como por ejemplo resinas de urea/formaldehído), harinas de soja, ceras, estearatos y aceites (como aceite de ricino).

50 Otros auxiliares que se pueden utilizar en el cebo o la composición de microgránulos de la presente invención incluyen por ejemplo aglutinantes (como metilcellosolve, polivinil pirrolidona, poli(alcohol vinílico), poli(acrilatos), polimetacrilatos, ceras naturales, ceras químicamente modificadas y ceras sintéticas, azúcares, almidón, alginatos, agar, lignosulfonatos y goma arábica), humectantes (como polialcoholes, por ejemplo azúcares y glicerol), conservantes, colorantes y repelentes para especies de sangre caliente.

55 La composición de cebo puede revestirse también para protegerla contra la degradación por la humedad y la consiguiente filtración de pimetrozina en el suelo. Dicho revestimiento puede extender la vida de la composición de cebo y reducir la frecuencia de re-aplicación necesaria. Convenientemente, las composiciones de cebo no se degradan prematuramente cuando se aplican en suelo húmedo.

60 La composición de cebo se proporciona normalmente en forma de granulado o microgránulos. El tamaño de los microgránulos es el adecuado para asegurar que los gasterópodos diana los consumen. Normalmente, los microgránulos tienen una longitud de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mm de longitud.

Otro aspecto de la invención proporciona una planta transgénica o progenie de la misma que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de fusión de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

65 Otro aspecto de la invención proporciona una planta transgénica o progenie de la misma que comprende una

proteína de fusión de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

Tal como podrán apreciar las personas especializadas, además de utilizar la proteína de fusión del primer aspecto de la invención en un plaguicida, puede prepararse una planta transgénica que incluya una secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicha proteína. Cuando se regula de la manera correcta, la planta transgénica sintetizará el péptido de fusión. Por lo tanto, la planta transgénica de este aspecto de la invención contendrá el péptido de fusión y, por tanto, tendrá actividad plaguicida.

Se puede modificar distintas variedades de especies vegetales para que incluyan la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el péptido de fusión.

Las personas especializadas sabrán que es posible utilizar cualquier planta monocotiledónea o dicotiledónea. Una planta dicotiledónea se puede seleccionar entre familias que incluyen, pero sin limitarse a ellas Asteráceas, Brasicáceas (p.ej., *Brassica napus*), Quenopodáceas, Curcubitáceas, Legumináceas, (Cesalpiniáceas, Esalpiniciáceas Mimosáceas, Papilionáceas o Fabáceas), Malvacáceas, Rosacáceas o Solanacáceas. Por ejemplo, se puede seleccionar la planta entre lechuga, girasol, Arabidopsis, brécol, espinaca, melón, calabacín, calabaza, tomate, patata, pimiento, tabaco, algodón, quingombó, manzana, rosa, fresa, alfalfa, frijol, soja, habas, guisantes, lentejas, cacahuete, garbanzos, albaricoques, peras, melocotón, uva o cítricos.

Se incluyen asimismo cultivos para biocombustible o bioenergía como, por ejemplo, caña de azúcar, semilla de aceite de colza/canola, linaza y sauce, chopo, híbridos de chopo, Miscanto o gimnospermas, como pino taeda. Se incluyen también cultivos para ensillado de hierba (p.ej., maíz se forraje, pasto o forraje, hierba, trébol, esparceta, alfalfa), fibras (p.ej., algodón, lino), materiales para construcción (p.ej., pino, roble), pulpa (p.ej., chopo), material para piensos para la industria química (p.ej., aceite de semilla de colza con alto contenido de ácido erúxico, linaza).

Una planta monocotiledónea, puede seleccionarse por ejemplo de las familias de las Arecáceas, Amarillidacáceas o Poacáceas. Por ejemplo, la planta puede ser un cultivo de cereal, como trigo, arroz, cebada, maíz, avena, sorgo, centeno, cebolla, puerro, mijo, trigo sarraceno, turba, gramíneas, pasto, Miscanto, caña de azúcar o especies Festuca.

Preferentemente, la planta es una planta de cultivo. Se entiende por planta de cultivo cualquier planta que se cultive a escala comercial para el consumo humano o animal o para su uso en otro uso distinto a alimento/forraje. Entre las plantas preferentes se incluyen maíz, tabaco, trigo, arroz, aceite de semilla de colza, sorgo, soja, patata, tomate, centeno, guisantes, frijoles, habas, algodón, lechuga, brécol y otros tubérculos forrajeros.

Se introduce una secuencia o vector descrita en el presente documento que codifica la proteína de fusión del primer aspecto de la invención como transgen en la planta. Esto se puede llevar a cabo a través de diversos métodos conocidos en el campo de la ingeniería genética vegetal, por ejemplo utilizando transformación con Agrobacterium, bombardeo de partículas, electroporación o transformación viral. Dichas técnicas son conocidas dentro de la técnica. También es conocido el uso de técnicas específicas para cada una de las especies vegetales enumeradas. Las personas especializadas en la técnica podrán adoptar los métodos de la técnica fácilmente para preparar una planta transgénica o progenie de la misma que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de fusión de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

Cuando se utiliza para preparar una planta transgénica de este aspecto de la invención, el ácido nucleico que codifica el péptido de fusión está situado normalmente placed dentro de un "casete de expresión" adecuado para ordenar la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos en la planta.

Preferentemente, el ácido nucleico que codifica el péptido de fusión estará unido operativamente a otra región del ácido nucleico que codifica el péptido señal de GNA, que estará situado para que el péptido señal esté presente en el extremo N del péptido de fusión. El péptido señal de GNA es útil ya que favorece una producción con éxito de las proteínas de fusión en las plantas. A continuación, se proporciona un ejemplo de una secuencia de aminoácidos de un péptido señal de GNA que se puede utilizar para la proteína de fusión expresada por la planta en este aspecto de la invención como SEQ ID NO: 15 en relación con otro aspecto más de la invención.

El casete de expresión contendrá normalmente una secuencia de ácidos nucleicos que actúa para regular la expresión del ácido nucleico en la planta, p.ej. una región promotora.

Algunos promotores pueden accionar la expresión constitutiva del ácido nucleico en la planta, incluyendo el promotor 35S, promotor 19S y promotor ubiquitina perfectamente conocidos.

Se pueden utilizar otros promotores para regular la expresión específica de órgano o tejido en la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de fusión. Un "promotor específico de tejido" o "promotor preferente de tejido" se refiere a un promotor regulado que no es expresado en todas las células de la planta, sino solamente en uno o más tipos de células en órganos específicos (por ejemplo, las hojas o las semillas), tejidos específicos (como el embrión o el cotiledón) o tipos de células específicas (por ejemplo parénquima de las hojas o células de almacenamiento seminal). También incluyen promotores que se regulan temporalmente, como por ejemplo en

- embriogénesis temprana o tardía, durante la maduración de la fruta en el desarrollo de semillas o frutos, en la diferenciación completa de la hoja o en el inicio de la secuencia. Entre los promotores adecuados se incluyen promotor de napingen de semilla de colza, y promotor de USP de *Vicia faba*, el promotor de oleosina de *Arabidopsis*, el promotor de faseolina de *Phaseolus vulgaris*, el promotor de Bce4- de Brassica o el promotor de legumina B4 así como promotores que confieren una expresión específica de semilla en plantas monocotiledóneas.
- Los promotores activos en el tejido fotosintético para guiar la transcripción en tejidos verdes, como hojas y tallos, incluyen promotores de ribulosa -1,5-bisfosfato carboxilasa (RbcS), como promotor de RbcS de alerce oriental (*Larix laricina*), promotor del pino cab6, promotor de gen Cab-1 del trigo, el promotor CAB-1 de la espinaca, el promotor cabIR del arroz, el promotor de piruvato ortofosfato diquinasa (PPDK) del maíz, el promotor de *Arabidopsis thaliana* SUC2 sacarosa-H⁺ symporter. Las personas especializadas en la técnica podrán identificar fácilmente la secuencia de ácidos nucleicos representativa de dichos promotores por ejemplo, del GenBank.
- Los promotores adecuados para la expresión preferente en tejidos de la raíz de la planta incluyen por ejemplo, el promotor derivado del gen de nicotinamina sintasa del maíz y el promotor RCC3 del arroz.
- Los promotores adecuados para una expresión preferente en los tejidos vasculares de la planta incluyen por ejemplo gen sintasa-1 de la sacarosa del arroz (RSs1).
- Entre los promotores inducibles se incluyen promotores que son responsables de estímulos del entorno abióticos y bióticos. Entre los estímulos del entorno abióticos se incluyen disponibilidad de luz, temperatura y agua. Entre los estímulos del entorno bióticos se incluyen patógenos (incluyendo promotores inducidos por virus, inducidos por bacterias, inducidos por hongos, inducidos por insectos e inducidos por nematodos), interacciones con simbiosis y herbívoros. Los promotores pueden responder al movimiento, contacto, daño tisular y fitohormonas (incluyendo ácido abscísico, citoquinas, auxinas, giberelinas, etileno, brassiconosteroides y péptidos como sistemina y factores de nodulación). Los promotores temporalmente regulados incluyen promotores regulados circadianos así como los que responden a mecanismos de cronometraje no circadianos.
- Los promotores que se pueden inducir químicamente son especialmente adecuados si se desea la expresión génica en un momento específico. Entre los ejemplos de dichos promotores se incluyen promotor inducible por ácido salicílico, promotor inducible con tetraciclina y promotor inducible con etanol. (patente internacional WO 93/21334).
- Para mejorar la expresión en plantas, se puede modificar el uso de codón del ácido nucleico que codifica la proteína de fusión para formar un gen o una parte del gen equivalente, modificado o artificial de acuerdo con técnicas para aumentar la eficiencia de la expresión de la proteína de fusión en células vegetales. Por otra parte, es posible insertar también el ácido nucleico en el plástido (p.ej., cloroplasto) o genoma mitocondrial de una planta y expresarlo ahí utilizando un promotor adecuado. Para mejorar la expresión en plantas monocotiledóneas como maíz o arroz, se puede añadir también un intrón (p.ej., un intrón monocotiledóneo) a un gen quimérico.
- Puede ser preferente que los ácidos nucleicos quiméricos de la invención (y adecuados para su uso en los métodos de la invención) comprendan además una secuencia de ácidos nucleicos para la expresión de productos que pueden favorecer la identificación de células vegetales en las que se han logrado incorporar secuencias quiméricas de ácidos nucleicos. Para las personas especializadas serán evidentes ejemplos de otra secuencia de ácidos nucleicos adecuada que se pueden utilizar de esta manera, e incluyen ácidos nucleicos que dan lugar a productos que confieren resistencia a sustancias que se pueden utilizar para la selección (por ejemplo antibióticos) o marcadores que dan lugar a un producto detectable que se puede utilizar como base para la selección (como por ejemplo producto de enzima cromogénica).
- Se proporciona asimismo una planta transformada con un ácido nucleico de acuerdo con el segundo aspecto de la invención (y cualquier realización del mismo descrita en la presente memoria descriptiva).
- Se proporciona asimismo una semilla vegetal que comprende un ácido nucleico de acuerdo con el segundo aspecto de la invención (y cualquier realización del mismo descrita en la presente memoria descriptiva).
- Un aspecto relacionado describe una planta transgénica o progenie de la misma que comprende una proteína de fusión que comprende: (i) una toxina proteica ButalT o un fragmento, variante o derivado de la misma, unida operativamente a (ii) una proteína capaz de mediar la translocación de la proteína de fusión desde el intestino de invertebrado.
- Los autores de la presente invención han investigado también la utilidad de otras toxinas de invertebrado para determinar si tienen utilidad como plaguicidas cuando se introducen en plantas. La toxina proteica ButalT es una toxina del escorpión rojo indio (*Mesobuthus tamulus*). Se ha demostrado previamente que ButalT tiene toxicidad oral para insectos cuando se prepara como una proteína recombinante y también que puede utilizarse GNA como una proteína capaz de mediar la translocación de la proteína de fusión desde el intestino de invertebrado.
- Los autores de la invención, por tanto, han investigado si la toxina ButalT, cuando se expresa como dicha proteína

de fusión en una planta transgénica, podría tener actividad plaguicida. Han observado que dicha planta transgénica puede expresar el péptido de fusión y además dichos péptidos tienen actividad plaguicida.

5 La toxina proteica ButaIT es conocida en la técnica. Se ha demostrado anteriormente que ButaIT puede bloquear los canales de calcio de invertebrados, pero no de los vertebrados. Las personas especializadas podrán identificar fácilmente ejemplos de secuencia de aminoácidos de la proteína ButaIT. A continuación, se proporciona un ejemplo de la secuencia de aminoácidos de ButaIT:

10 Toxina ButaIT (SEQ ID NO: 14)

RCGPCFTTDPQTQAKCSECCGRKGGVCKGPQCICGIQ

15 Se entiende como "fragmento o variante" de ButaIT que la proteína de fusión expresada por la planta de este aspecto de la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos de ButaIT que puede variar de la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 14 siempre y cuando el fragmento o variante retengan sustancialmente la actividad biológica de la toxina ButaIT. Anteriormente se ha proporcionado una explicación detallada de los términos "fragmento o variante" en relación con el primer aspecto de la invención y también se aplica a este aspecto de la invención.

20 La proteína de fusión expresada por la planta de este aspecto relacionado puede comprender como segunda porción una proteína capaz de mediar la translocación de la proteína de fusión desde el intestino de invertebrado.

Anteriormente, se han proporcionado ejemplos de proteína capaz de mediar translocación de la proteína de fusión desde el intestino de invertebrado en relación con el primer aspecto de la invención.

25 Entre las proteínas adecuadas capaces de mediar la translocación de la proteína de fusión desde el intestino de invertebrado se incluyen lectinas vegetales. Entre las lectinas vegetales adecuadas para su uso en el péptido de fusión se incluye una o más de las siguientes lectinas vegetales: lectina de galanto *Galanthus nivalis*, aglutinina (GNA), lectina de ajo *Allium sativum*, lectina de guisante *Pisum sativum* (P-lec), lectina de cacahuete *Arachis hypogaea*, lectina de judía verde (PHA, *Phytohaemagglutinin*). Generalmente, puede utilizarse cualquier lectina que se una al intestino del insecto.

30 Es particularmente preferente que la proteína sea una lectina vegetal seleccionada entre una cualquiera o más de las siguientes: lectina de galanto (GNA), lectina de ajo *Allium sativum*, lectina de guisante *Pisum sativum* (P-lec), lectina de cacahuete *Arachis hypogaea*, lectina de judía verde (PHA, *Phytohaemo glutinin*), o un fragmento o una variante de la misma.

35 Preferentemente, la lectina es GNA. Por tanto, la proteína de fusión expresada por la planta de este aspecto relacionado puede comprender una toxina proteica ButaIT, o un fragmento o derivado de la misma, unida operativamente a GNA y puede utilizarse como un plaguicida contra animales invertebrados que constituyen una plaga. Un ejemplo de la secuencia de aminoácidos de GNA se proporciona en el primer aspecto de la invención como SEQ ID NO: 3.

40 Las personas especializadas podrán apreciar que la proteína de fusión expresada por la planta de este aspecto relacionado puede prepararse para que la segunda porción, que es preferentemente un péptido GNA esté localizada en el extremo N de la toxina proteica ButaIT. Por tanto, dicho péptido de fusión tiene la disposición: NH₂-(GNA: ButaIT)-COOH. De hecho, los autores de la invención han preparado varios de dichos péptidos de fusión.

45 Al preparar la proteína de fusión expresada por la planta de este aspecto relacionado, los autores de la invención decidieron investigar si la disposición de las porciones primera y segunda de la proteína de fusión afectaba a la actividad plaguicida de la proteína. Observaron de manera sorprendente que, preferentemente, la planta transgénica de este aspecto de la invención expresa una proteína de fusión en la que el péptido GNA está localizado en el extremo C de la toxina proteica ButaIT, ya que, en esta disposición, el péptido de fusión tiene una actividad plaguicida mucho mayor. Hasta ahora no se había identificado que tuviera importancia el orden de la toxina en relación con la lectina en una proteína de fusión plaguicida para la actividad plaguicida. Por tanto, esta disposición tiene sorprendentemente una clara ventaja.

50 Por lo tanto, el péptido GNA puede estar situado en el extremo C de la toxina proteica ButaIT. Dicho péptido de fusión tiene la disposición: NH₂-(ButaIT: GNA)-COOH.

55 Asimismo, los autores de la invención han determinado también que es deseable que la proteína de fusión expresada por la planta de este aspecto relacionado comprenda un "péptido señal" GNA situado en el extremo N del péptido de fusión. El péptido señal GNA es una región de aminoácidos que dirige el transporte intracelular de la proteína de fusión al vacuolo de la célula vegetal.

60 A continuación, se describe un ejemplo de péptido señal GNA que puede utilizarse para la proteína de fusión expresada por la planta de este aspecto relacionado:

65

Péptido señal GNA (SEQ ID NO: 15)
MAKASLLILAAIFLGVITPSCLS

5 Por lo tanto, se describen los casos en los que la proteína de fusión expresada por la planta de este aspecto relacionado puede tener la siguiente disposición: NH₂-(péptido señal GNA: ButalT: GNA)-COOH.

A continuación, se proporciona un ejemplo de dicho péptido:

10 NH₂-(péptido señal GNA: ButalT : GNA)-COOH (SEQ ID NO: 16)

MAKASLLILAAIFLGVITPSCLSAAARCGPCFTTDPQTQAKCSECCGRKGGVCKGPGQCICGIQAAADNII
YSGETLSTGEFLNYGSFVFMQEDCNLVLYDVKPIWATNTGGLSRSCFLSMQTDGNLVVYNPSNKP IWA
SNTGGQNGNYVCILQKDRNVVIYGTDRWATG

15 Los ejemplos de moléculas de ácido nucleico que codifican los péptidos ButalT y GNA son muy conocidos en la técnica. A modo de ejemplo, a continuación, se proporciona la secuencia de una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión expresada por la planta de este aspecto relacionado.

Secuencia de ácidos nucleicos que codifica NH₂-(péptido señal GNA: ButalT : GNA)-COOH (SEQ ID NO: 17)

ATGGCTAAGGCAAGTCTCCTCATTTTGGCCGCCATCTTCCTTGGTGTGCATCACACCATCTTGCCTGAGTGCTGCAGCAAGGTGTGGTC
CTTGCTTTACAACCTGATCCTCAAACACAAGCCAAAGTGTAGTGAGTGTTGTGGGCGAAAGGGTGGAGTATGCAAGGGCCCACAATGTAT
CTGTGGTATACAAGCGGCCGCCGACAATATTTTGTACTCCGGTGAGACTCTCTCTACAGGGGAATTTCTCAACTACGGAAGTTTCGTT
TTTATCATGCAAGAGGACTGCAATCTGGTCTTGTACGACGTGGACAAGCCAATCTGGGCAACAAACACAGGTGGTCTCTCCCGTAGCT
GCTTCCTCAGCATGCAGACTGATGGGAACCTCGTGGTGTACAACCCATCGAACAAACCGATTTGGGCAAGCAACACTGGAGGCCAAAA
20 TGGGAATTACGTGTGCATCCTACAGAAGGATAGGAATGTTGTGATCTACGGAACTGATCGTTGGGCTACTGGATGA

Los métodos de preparación de dichas moléculas de ácido nucleico se han descrito anteriormente, pues son los métodos de preparación de una planta transgénica de este aspecto relacionado.

25 Otro aspecto más de la invención proporciona el uso de una proteína de fusión de acuerdo con el primer aspecto de la invención en la fabricación de un plaguicida o una célula vegetal o planta transgénica.

Un aspecto más de la invención proporciona el uso de un plaguicida de acuerdo con el sexto aspecto de la invención para destruir o debilitar una o más plagas.

30 **Figura 1:** Representación gráfica de construcciones creadas para la expresión de proteína de fusión omega/GNA (FP5) en el vector de expresión de levadura pGAPZαB. Se representa el reemplazamiento de lisina por glutamina (Q) en la secuencia de aminoácidos omega para MODomega/GNA y His/GNA/MODomega.

35 **Figura 2:** SDS-PAGE (17,5 % gel de acrilamida) análisis de variantes omega/GNA tras purificación y liofilización. La carga como sigue: 1 representa omega/GNA/His; 2 omega/GNA; 3 MOD.omega/GNA modificada, 4 His/GNA/omega y 5 His/GNA/MOD.omega. La carga para cada calle se da como peso en seco total (µg) de muestra liofilizada y carga de patrones de GNA se da en µg de proteína recombinante.

40 **Figura 3:** Análisis de transferencia de Western de omega/GNA (ωACTX/GNA) purificada recombinante utilizando (A) anticuerpos anti-GNA y (B) anticuerpos anti-omega (ωACTX) (dilución 1:3300 y 1:1000, respectivamente). Análisis de transferencia de western de (C) His/GNA/omega purificada recombinante (His/GNA/ωACTX) y (D) His/GNA/omega modificada recombinante (His/GNA/MOD-ωACTX) utilizando anticuerpos anti-His y anti-omega (ωACTX) (dilución1:1000). Se representa la carga de proteína en ng.

45 **Figura 4:** Supervivencia de larvas de la polilla de la calabaza (*M. brassicae*) a las que se inyectaron en cuatro variantes de proteínas de fusión omega/GNA o control (PBS) o péptido omega (ACTX) en solitario (n=10-20 por tratamiento). Las dosis de 20 y 10 µg de proteína de fusión son equivalentes a dosis de 4,6 y 2,3 µg de omega en solitario sobre una base molar.

50 **Figura 5:** (A) Peso medio de larvas de *M. brassicae* de quinto instar alimentadas diariamente con gotas que contienen omega (ωACTX) u omega/GNA (ωACTX/GNA) (n= 7 por tratamiento). La dosis de toxina omega es equivalente a la dosis de toxina omega contenida en 40 µg de proteína de fusión. (B) Peso medio de larvas en el cuarto instar alimentadas con una sola gota con un contenido de 40 µg omega/GNA.

55 **Figura 6:** Supervivencia y peso medio larvas de *M. brassicae* alimentadas con dietas con contenido de

omega/GNA o His/GNA/omega a 2,5 mg/5 g de dieta (500 ppm) o GNA (5 mg/5 g; 1000 ppm) y control sin añadir proteína. N= 20 por tratamiento.

5 **Figura 7:** Fotografía de plantas tras la exposición a larvas de escarabajo de la patata, tal como se representa en la Tabla 2. 1 representa el control; 2 MODomega/GNA; 3 His/GNA/omega; 4 His/GNA/MODomega; 5 omega/GNA/His; 6 FP4 (RST/GNA/His).

10 **Figura 8:** Supervivencia de pulgones del cereal (*Sitobion avenae*) expuestos a dietas (n=20 por tratamiento) con contenido de variantes FP5 a 0,5 mg/ml (500 ppm) durante 6 días.

15 **Figura 9:** Supervivencia de babosas grises grandes adultas (*D. reticulatum*) 7 días tras la inyección de 50 o 100 µg de omega/GNA/His equivalente a 12,5 y 25 µg toxina omega, respectivamente (control n=18; omega/GNA/His n= 18 y 27 para 50 y 100 µg de omega/GNA/His, respectivamente).

20 **Figura 10:** (A) Consumo de hoja acumulativo y (B) peso medio de babosas jóvenes alimentadas con discos de lechuga revestidos con omega/GNA/His (1 mg/disco de hoja) registrado al cabo de 7 y 14 días (n=20 por tratamiento).

25 **Figura 11:** Peso medio registrado para *D. reticulatum* jóvenes 7 y 14 días tras la exposición a microgránulos de trigo con contenido de omega/GNA/His a 1,3 % p/p. Se analizaron las babosas hambrientas en cuanto a la ganancia de peso como tratamiento de control y las babosas alimentadas con microgránulos sin añadir proteína (n=20 por tratamiento) proporcionaron un segundo de control en ambos bioensayos A y B.

30 **Figura 12:** (A) Supervivencia y (B) peso medio de dos grupos (10-20 mg y 30-40 mg) de *D. reticulatum* jóvenes alimentadas con microgránulos con contenido de metaldehído comerciales; microgránulos de trigo con contenido de His/GNA/omega (2,2 % p/p), o microgránulos de trigo de control sin contenido de proteína añadido. Se incluyó un grupo de babosas hambrientas como control negativo. (n=20 por tratamiento).

35 **Figura 13:** Representación gráfica de la región T-ADN del vector de expresión pK2WG7 que contenía construcciones de expresión. Se muestra en verde GNA líder (secuencia señal), la secuencia de GNA madura en amarillo y la toxina ButalT en azul. LB, RB = bordes izquierdo y derecho de ADN-T; No. Prom., NPTII, No. Term. = construcción para la expresión de neomicina fosfotransferasa, que da resistencia a kanamicina (marcador seleccionable); 35S = virus del mosaico de la coliflor (CaMV) promotor ARN 35S; 35S Term. = gen terminador 35S; B1, B2 = sitios de recombinación Gateway.

40 **Figura 14:** Transformantes (T₀) desarrollados en placas de medios 0,5 x MS10 con 50 µg/ml kanamicina. (a) Semillas germinadas de plantas sumergidas en *Agrobacterium* que contiene construcción líder GNA /GNA/ButalT. (b) Semillas germinadas de plantas sumergidas en *Agrobacterium* que contienen la construcción líder GNA/GNA.

45 **Figura 15:** Análisis de transferencia de Western (con sonda de anticuerpos anti GNA) de *Arabidopsis* estadio T3 transgénico utilizados en bioensayos (A) expresión de GNA; 25 µg (a) y 50 µg (b) de tres plantas independientes (1,2,3) (B) expresión de ButalT/GNA (línea 40); 25 µg (a) y 50 µg (b) de tres plantas independientes (1,2,3) (C) ButalT/GNA pat 50 ng (1), GNA pat 50 ng (2), GNA/ButalT pat 50 ng (3), Línea 45 50 µg (4), (D) expresión de GNA/ButalT (línea 5); 25 µg (a) y 50 µg (b) de dos plantas independientes (1 y 2).

50 **Figura 16:** (A) Gráficos de supervivencia Kaplan-Meier de larvas de polilla del tomate (*Lacanobia oleracea*) (n=40 por tratamiento, * representa n=60) expuestas a GNA (línea 3) y ButalT/GNA (línea 40) que expresan hojas de *Arabidopsis* durante 14 días desde la eclosión y (B) peso medio (± SEM) de insectos supervivientes (x representa n=20)

55 **Figura 17:** (A) Gráficos de supervivencia Kaplan-Meier de larvas *Lacanobia oleracea* (n=20 por tratamiento, * representa n=60, **representa n=40) expuestas a GNA (línea 3), ButalT/GNA (línea 45) y GNA/ButalT (línea 5) que expresan hojas de *Arabidopsis* durante 14 días desde la eclosión y (B) peso medio (± SEM) de insectos supervivientes (n=20)

60 **Figura 18:** Bioensayo de toxicidad oral aguda con abejas obreras adultas. Se alimentaron insectos (n=60 por tratamiento) con sacarosa (control negativo), GNA (100 ug/abeja), FP5 (100 ug/abeja) o Acetamiprid a tres concentraciones diferentes, cubriendo la LD₅₀ de 14,5 ug/abeja registrada. Se registró la mortalidad al cabo de 4h, 24h y 48h desde el inicio del ensayo. Tras el análisis de supervivencia Kaplan-Meier, todos los tratamientos difirieron significativamente unos de otros, con la excepción de la comparación entre los tratamientos con GNA y FP5. Los bajos índices de mortalidad registrados para ambos tratamientos indican que su LD₅₀ para las abejas fue superior a 100 ug/abeja.

65 **Figura 19:** Análisis de supervivencia Kaplan-Meier para el ensayo de toxicidad de contacto aguda de GNA y FP5 con abejas. Se utilizó acetamiprid como control positivo a tres concentraciones diferentes. No se observó

ninguna diferencia significativa entre GNA o FP5 y el control negativo (Tween 0,05%), lo que indica una falta de toxicidad de contacto de estas proteínas hacia las abejas. En las concentraciones de LD₅₀ registradas (8,09 µg/abeja) y 16,18 µg/abeja, el control positivo difirió significativamente del control negativo y los tratamientos con GNA o FP5.

5 **Figura 20(A)** presenta la supervivencia registrada para babosas alimentadas con microgránulos que contienen 0 (control), 1 %, 2,5 % y 5 % (p/p) de proteína de fusión. Los tratamientos de control adicionales con hojas de lechuga y un control negativo sin dieta. (B) Peso medio de las babosas en el comienzo (día 0) y al final (día 14) del bioensayo.

10 **Figura 21(A)** presenta una representación gráfica construcción de expresión de levadura pGAPZαB utilizada para la clonación de genes que codifican FP5. (B) Representación gráfica en la que se muestra la inserción de casete FP5 y (C) modificación de vector para permitir la inserción de más de un casete FP5.

15 **Figura 22** presenta los resultados del análisis PCRc de clones de levadura clones transformados con ADN de plásmido que contenía 5 copias del casete FP5. RQ representa la cantidad relativa de productos ampliados derivados de los valores CT (ciclo umbral). El clon no se representa en el eje de las y.

20 **Figura 23** presenta un análisis representativo de (A) niveles de expresión de FP5 por transferencia de western (anticuerpos anti-GNA) de muestras de sobrenadante obtenidas de cultivos de levadura a pequeña escala. Se cargaron volúmenes equivalentes para todas las muestras analizadas (B) análisis PCRc de clones

25 **Figura 24** presenta el análisis de PCRc de clones de levadura (SMD), seleccionados de fermentación en laboratorio. SMD corresponde a levadura ultraformada.

30 **Figura 25 (A)** presenta la absorbancia (O.D. 600 nm) (B) peso de microgránulos húmedos y (C) tasa de alimentación de glicerol registrada durante la fermentación en laboratorio de clones de levadura seleccionados con un contenido de 2, 5 y 8 casetes FP5 de expresión (basado en la PCRc).

35 **Figura 26** presenta análisis SDS-PAGE representativos (17,5 % de gel de acrilamida) del rendimiento de fermentación de clones que llevan más de un casete FP5. Antes de cargarlas, se desalaron las muestras tal como se ha descrito. Calle 1 es la mezcla de marcador de peso molecular patrón (Sigma SDS-7; 66, 45, 36, 29, 24, 20 y 14 kDa).

40 **Figura 27** presenta análisis de transferencia de western (anti-GNA anticuerpos) de sobrenadantes de cultivo obtenidos tras la fermentación de clones que llevan más de un casete FP5. Se hicieron correr las muestras en geles de SDS-PAGE, se transfirieron a nitrocelulosa y se sondearon tal como se ha descrito anteriormente. Se estima el rendimiento en comparación con la inmuno-reactividad de FP5 intacto con patrones GNA de concentración conocida.

45 **Figura 28: Producción y purificación de proteína.** (A) Esquema de construcción que codifica Hv1a/GNA que presenta masas moleculares previstas de Hv1a y GNA así como la masa total de la proteína de fusión Hv1a/GNA que incluye la región de engarce de tri-alanina y los dos restos alanina adicionales en el extremo N. (B) gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie (17,5 % acrilamida) de Hv1a/GNA recombinante y GNA tras la purificación por interacción hidrófoba y cromatografía de filtración de gel. La carga de proteína aproximada (µg) se indica por encima de cada calle, mientras que la calle marcada "M" contiene patrones de peso molecular (Sigma SDS-7). (C) Material compuesto de transferencias de Western de proteínas recombinantes utilizando (i) anticuerpos anti-GNA y (ii) anti-Hv1a. La carga de proteína aproximada (ng) se representa arriba en cada calle. FP representa proteína de fusión Hv1a/GNA.

50 **Figura 29:** Ensayos de alimentación con gotas. (A) Peso medio de larvas de *M. brassicae* en el quinto estadio alimentadas diariamente con gotas de sacarosa que contenía 9,2 µg Hv1a, 40 µg Hv1a/GNA, o 40 µg de albúmina de suero bovino (control BSA,). Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con Hv1a/GNA y control o Hv1a en los días 1-4 (ANOVA Tukey post hoc; día 1, P= 0,0003; días 2-4, P<0,0001). La imagen representa larvas de control a la izquierda (larvas alimentadas con BSA y Hv1a) y larvas alimentadas con Hv1a/GNA- a la derecha. (B) Peso medio de larvas de *M. brassicae* en el quinto estadio alimentadas con una sola gota de sacarosa con un contenido de 40 µg Hv1a/GNA o control 40 µg BSA. Las diferencias en los pesos medios entre los tratamientos con control y proteína de fusión fueron significativos desde el día 1 al día 6 del ensayo (t-prueba; P<0,05). **[esto no parece que se ajuste a la figura]**

55 **Figura 30:** Ensayos de disco de hoja. (A) Supervivencia de larvas de *M. brassicae* del segundo estadio alimentadas con discos de calabaza revestidos con GNA recombinante purificada (0,2 % p/p) o Hv1a/GNA (0,2 % p/p y 0,1 % p/p) o discos de control revestidos con PBS (n = 20 por tratamiento). (B) Peso medio de larvas registrado el día 10,

60 **Figura 31:** Análisis de hemolinfa y cordones nerviosos. Análisis de inmunotransferencia utilizando anticuerpos

anti-GNA de (A) muestras de hemolinfa extraídas de larvas de *M. brassicae* 48 h después de alimentarlas con dieta que contiene Hv1a/GNA (dieta 2 mg/5 g). "C" representa hemolinfa de control (larvas alimentadas con una dieta sin añadir proteína). Las calles 1 y 2 son replicados de muestras agrupadas (3 larvas por muestra); se cargaron 15 μ l de hemolinfas en todos los casos. (B) Muestras de cordón nervioso diseccionado de larvas en el sexto estadio a las que se les ha inyectado 25 μ g GNA (calles 1-4) o Hv1a/GNA (calles 5-8). Se extrajeron muestras agrupadas 3 h (calles 1,2,5 y 6) o 5 h (calles 3, 4, 7 y 8) tras la inyección. Se extrajeron muestras agrupadas (4 cordones nerviosos por muestra) directamente en 40 μ l tampón SDS- muestra y se cargaron 20 μ l por calle. "C" representa una muestra de cordón nervioso de control. En los paneles (A) y (B), S1 y S2 son patrones de GNA y Hv1a /GNA de 50 ng respectivamente.

Figura 32: Unión de GNA a cordones nervios. (A) Cordón nervioso intacto diseccionado de larvas de *M. brassicae* en el sexto estadio. (B-F) Material compuesto de imágenes parciales de tractos nerviosos diseccionados de larvas a las que se les ha inyectado o están alimentadas con proteínas marcadas con FITC. Se visualizaron las imágenes con un microscopio fluorescente con un filtro FITC y se capturaron en OpenLab. B: FITCGNA; C: FITC-Hv1a/GNA; D: control FITC; E: FITC-ovalbúmina; F: FITC-GNA; G: FITC-Hv1a/GNA. Barra a escala = 2 mm en (A) y 200 mm en (B-E).

Ejemplo 1: Desarrollo de una proteína de fusión plaguicida

INTRODUCCIÓN

Se seleccionó un péptido veneno ω -ACTX-Hv1a, derivado de la araña de telaraña en embudo australiana (*Hadronyche versuta*) como péptido insecticida candidato para la unión con GNA. Se sabe que cuando se inyecta ω -ACTX-Hv1a tiene una potente actividad contra distintas variedades de insectos pero es inofensiva para ratones recién nacidos y no tiene efecto contra preparaciones de vertebrados-moluscos (Fletcher *et al.*, 1997; Chong *et al.*, 2006). Se cree que la toxina se dirige a canales de calcio abierto por ligando- voltaje de insectos que están relacionados con una amplia gama de procesos intracelulares incluyendo contracción del músculo, liberación de hormonas y neurotransmisores, neurotransmisión y regulación de reacciones enzimáticas y expresión génica (Catterall 2000).

Se creó una proteína de fusión que lleva incorporado ω -ACTX-Hv1a (denominada omega/GNA o FP5) y se sometió a ensayo contra diversas plagas de insectos. Se crearon cinco versiones diferentes de proteína de fusión omega/GNA y se expresaron en *Pichia pastoris* y se evaluaron todas ellas en cuanto a su actividad insecticida.

B. MÉTODOS Y MATERIALES

B.1 Ensamblaje de construcciones de expresión para proteína de fusión omega/GNA

Se utilizó la secuencia de aminoácidos de ω -ACTX-Hv1a (Genbank [P56207]) como base para el ensamblaje de un gen omega sintético. Se optimizó el uso de codón para la expresión de toxina omega en levadura. Se subdividió la cadena de codificación en 2 fragmentos y se subdividió la cadena complementaria en 3 fragmentos, de manera que los fragmentos de codificación se solaparon con los fragmentos de cadena complementaria 21 bases. Se sintetizaron cinco cebadores de oligonucleótido sobre la base de estos fragmentos y se utilizaron en una reacción de ensamblaje de la secuencia de codificación de omega madura completa. Se fosforilaron en 5' todos los cebadores individualmente utilizando la enzima T4 polinucleótido quinasa (Fermentas). Se sometió a ebullición una solución equimolar (100 pmoles de cada cebador) de los cebadores fosforilados durante 10 minutos, para desnaturalizar estructuras secundarias y se enfrió lentamente a temperatura ambiente para permitir que los cebadores se hibridaran. Tras la adición de T4 ADN ligasa (Promega) se permitió que se ligaran los cebadores hibridados (en tampón ligasa) durante toda la noche a 4 °C. Para obtener suficiente ADN para clonación en el vector de expresión de levadura pGAPZ α B, se amplificó la secuencia de codificación de omega por PCR utilizando cebadores que contenían sitios de restricción 5' *Pst*I y 3' *Not*I. Tras la amplificación, purificación con gel y la digestión de restricción, se ligó el fragmento omega en una construcción de expresión de levadura generada previamente (Trung *et al.*, 2006) que contenía la secuencia de codificación de GNA madura para crear omega/GNAPGAPZ α B.

Se creó también una segunda construcción en la que se incorporó una etiqueta de histidina de seis restos en el extremo C de la secuencia codificante de omega/GNA. Se amplificó la secuencia codificante de GNA madura por PCR utilizando cebadores que contenían sitios 5' *Not*I y 3' *Sa*I. La introducción de un sitio 3' *Sa*I permite la inserción de la secuencia GNA en el marco con la etiqueta de histidina C-terminal codificada por el vector pGAPZ α B. Tras la digestión de restricción de omega/GNAGAPZ α B y la ligación del fragmento de PCR de GNA se creó una nueva construcción omega/GNA/HispGAPZ α B.

Orientación de omega péptido en relación con GNA

Se creó una tercera construcción en la que estaba ligada la secuencia codificante para la atracotoxina omega con el extremo C de GNA del siguiente modo. Se amplificó la secuencia de codificación de omega (creada tal como se ha descrito) por PCR, utilizando cebadores que contenían sitios de restricción 5' *Not*I y 3' *Sa*I (incluyendo codón de

parada). Tras la amplificación, purificación con gel y digestión de restricción, se ligó el fragmento omega en una construcción de expresión de levadura generada previamente que contenía la secuencia codificante de GNA que incluyó una etiqueta His de seis restos N-terminal para crear HisGNA/omegapGAPZαB.

5 *Modificación para mejorar la estabilidad de proteína de fusión durante la expresión y fermentación*

Para reducir la escisión de la proteína de fusión durante la expresión y purificación, se realizó una modificación de la secuencia omega. Para ello, se creó otra construcción según lo cual el resto número 34 en la toxina omega (lisina; K) se reemplazó por glutamina (Q) por mutagénesis dirigida a sitio. Esta modificación eliminó un posible sitio de escisión de señal Kex 2 (KR) presente en el extremo C de la toxina omega. Se modificó la secuencia omega por PCR utilizando cebadores de codificación de un cebador de sitio 5' *Pst* I y 3' de codificación de un extremo C modificado (como se ha señalado) y sitio *Not* I. El producto de PCR estaba restringido y ligado en omega/GNApGAPZαB digerido de manera similar.

15 Se creó otra construcción más según lo cual se insertó la secuencia omega modificada en el extremo C de GNA. Se amplificó la secuencia de codificación del péptido omega modificada por PCR, utilizando cebadores que contenían sitios 5' *Not* I y 3' *Sall*. Tras la purificación con gel, se digirió el producto de PCR (*Not* I y *Sall*) y se ligó en vector pGAPZαB digerido de manera similar que contenía etiqueta Histidina N-terminal y la secuencia de codificación de GNA. En la Figura 1 se muestra una representación gráfica de las cinco construcciones.

20 *Expresión y purificación de proteínas de fusión omega/GNA*

Se transformaron construcciones para expresar proteínas recombinantes en *P. pastoris* (cepa SMD1168H). Se seleccionaron transformantes colocándolos en placas sobre medios que contenían zeocina (100 µg/ml). Se seleccionaron clones que expresaban proteínas recombinantes para la producción por fermentación en laboratorio por análisis de transferencia de Western de sobrenadantes de cultivos a pequeña escala utilizando anticuerpos anti-GNA anti-GNA (dilución 1:3300) y anti-ω-ACTXHv1a (omega) (dilución 1:1000) suministrados por Prof. Glenn King (Queensland University, Australia).

30 Para la producción de proteínas, se cultivaron células de *P. pastoris* que contenían secuencias de codificación de proteína de fusión en un fermentador de laboratorio BioFlo 110. Brevemente, para la fermentación, se utilizaron 3 x 50 ml de cultivos de YPG (1 % extracto de levadura [p/v]; 2 % peptona [p/v]; 4 % glicerol [v/v]) (cultivados durante 2-3 días a 30 vC con agitación) para inocular 3 l de medios mínimos estériles (Higgins y Creggs, 1998) suplementados con PTM1 (Cino, 1999). Se continuó el cultivo a 30 °C, 30 % oxígeno disuelto, pH 4,5 – 5,0 con agitación continua con alimentación de glicerol (5-10 ml/h; 1,3 l durante 72 h). Se separaron las proteínas secretadas de las células por centrifugación (30 min a 7500 x g). Para proteínas recombinantes omega/GNA y MOD.omega/GNA, se añadió NaCl al sobrenadante hasta una concentración final de 2M. A continuación, se purificaron las proteínas recombinantes por cromatografía de interacción hidrófoba sobre una columna de fenil-sefarosa (Amersham Pharmacia Biotech.) (1 cm diámetro, 25 ml), corriendo a 2 ml/min. Después de la carga, se lavó la columna de fenil-sefarosa con NaCl 2 M, y se eluyó con un gradiente de sal lineal (2M-0M) aplicado durante 60 minutos. Las proteínas recombinantes eluyeron a aproximadamente 1M NaCl. Para las proteínas de fusión que contenían etiquetas de histidina, se diluyó el sobrenadante de cultivo 1 en 4 con 4 x tampón de unión (BB; 0,02 M fosfato sódico; 0,4 M NaCl; pH 7,4). Se cargaron los sobrenadantes en columnas de Ni-NTA (afinidad de níquel) (columnas 5 ml HisTrapFF de GE Healthcare). Normalmente, se ligaron columnas de 2 x 5 ml y se cargaron los cultivos a 3-4 ml/min durante 3-10 horas a temperatura ambiente con ciclación. Después de la carga, se lavaron las columnas con 1x BB y se eluyeron las proteínas desde las columnas con BB que contenía 0,15- 0,2 M imidazol).

A continuación, se dializaron las fracciones que contenían proteínas purificadas (analizadas por SDS-PAGE) contra agua destilada y se liofilizaron. Posteriormente, se evaluaron las muestras liofilizadas en cuanto a su pureza y contenido de proteína de fusión pro SDS-electroforesis con gel de poliacrilamida. Se estimaron las concentraciones de proteínas recombinantes por comparación con cantidades conocidas de proteínas patrón por SDS-PAGE.

Actividad biológica de proteínas de fusión omega/GNA

55 (i) *Bioensayos de inyección: Mamestra brassicae* (Lepidópteros)

El péptido omega purificado fue suministrado por Prof. Glenn King (Queensland University, Australia) y se analizaron variantes omega/GNA en cuanto a la actividad biológica inyectando 4-5 µl de muestras acuosas (proteína liofilizada re-suspendida en PBS) en larvas de *M. brassicae* en el quinto estadio recién eclosionadas (30-70 µg). Para cada concentración analizada, se inyectaron 10 – 20 larvas y se llevó un seguimiento de los efectos tóxicos durante 3 días. Se inyectó PBS como control negativo.

(ii) *Ensayos de alimentación con gotas: M. brassicae*

65 Se llevaron a cabo varios ensayos de alimentación con gotas para evaluar la actividad oral de omega/GNA. En el presente documento se describen dos ensayos.

Ensayo de goteo 1: Se alimentaron diariamente larvas en el quinto estadio, recién mudadas durante 4 días con 5 µl de gotas que contenían 40 µl de omega/GNA o 0,6 µg de toxina omega en 1 x PBS y 10 % de solución de sacarosa. Se alimentó a las larvas de control con gotas que contenían 40 µl de BSA. Para estimular el consumo de las gotas, se privó de alimento a las larvas durante 2-3 horas antes de la alimentación. Se registró el peso de las larvas diariamente aproximadamente 1 hora después de la alimentación con gotas. Se colocaron las larvas tratadas individualmente en tiosos de plástico ventilados (250 ml) con dieta artificial normal. Al cabo de 4 días de alimentación con gotas diariamente se mantuvo a las larvas con una dieta óptima hasta el inicio de la pupación.

Ensayo de goteo 2: Se alimentó a larvas en el cuarto estadio recién mudadas con gotas de 5 µl que contenían 40 µg de omega/GNA o 40 µg de BSA (control) en 1 x PBS y 10 % de sacarosa. Se mantuvo a las larvas tal como se ha descrito y se registraron los pesos diariamente durante 10 días.

(iii) *Ensayos de alimentación con dieta artificial: M. brassicae*

Se incorporaron proteínas omega/GNA/His y His/GNA/omega purificadas a una concentración conocida (dieta 2,5 mg/5 g o 500 ppm) en dieta artificial (Bio-Serv; polvo que contenía harina de maíz, germen de trigo en bruto, levadura de cerveza, ácido ascórbico, ácido benzoico, metil parabenzoato) para analizar la actividad insecticida contra larvas de *M. brassicae*. Para preparar las dietas, se mezcló 1 g de polvo de dieta con 1 ml de agua destilada. Se añadió agar hervido (40 mg en 2 ml de agua destilada) a la mezcla y finalmente, se añadió la proteína de ensayo en 1 ml de agua destilada. Los tratamientos de control fueron GNA (a 5 mg/ 5 g o 1000 ppm) y la dieta sin añadir proteína. Se seleccionaron las larvas para su ensayo 48 horas después de eclosionar. Se analizaron dos replicados de 10 larvas por tratamiento. Se evaluó la supervivencia diariamente y se registraron los pesos en húmedo de las larvas cada dos días.

(iv) *Bioensayos contra escarabajo de la patata (Leptinotarsa decemlineata) (Isagro Ricerca)*

Se analizaron las cinco variantes de FP5 variantes (omega/GNA; omega/GNA/His; MOD.omega/GNA; His/GNA/omega; His/GNA/MODomega) en cuanto a la actividad biológica *in vivo* incluyéndolas en la alimentación de larvas de *Leptinotarsa decemlineata* de tres días de vida. En primer lugar, se disolvieron las proteínas en agua desmineralizada esterilizada pulverizada sobre plantas de patata jóvenes (350 ppm). Antes de la pulverización, se transfirieron las larvas de *L. decemlineata* a las plantas, para evaluar la eficacia de la ingestión y el contacto de la proteína de fusión. Se evaluó la mortalidad diariamente durante 6 días tras el tratamiento. En segundo lugar, para verificar la persistencia de la eficacia de FP5, se trasladaron algunas larvas a las plantas tratadas una, dos y tres semanas después del tratamiento de pulverización.

(v) *Bioensayos contra dípteros. Mosca de bombilla del trigo Delia coarctata*

Se analizó omega/GNA en cuanto a su actividad contra larvas de mosca de bombilla del trigo inyectando concentraciones conocidas (en 1 µl) de proteína purificada en una longitud del tallo de trigo de 2 cm. Se introdujeron larvas neonatas en el tallo y se llevó un seguimiento de la supervivencia al cabo de 3 y 7 días. Se colocaron las larvas supervivientes en un tallo recién inyectado al cabo de 3 días.

(vi) *Bioensayos contra homópteros. Pulgón del cereal Sitobion avenae*

Se utilizó una dieta artificial líquida (Douglas y Prosser 1992) para suministrar por vía oral las variantes FP5 a pulgones del cereal *Sitobion avenae*. Se incorporaron en la dieta Omega/GNA/His, MODomega/GNA, His/GNA/omega y His/GNA/MODomega a una concentración de 0,5 mg/ml (500 ppm). Se incluyeron dieta solamente y dieta con contenido de albúmina como tratamientos de control (100 µl de dieta artificial). Se utilizó un total de 100 µl de solución para cada cámara de alimentación de pulgones, que consistió en anillos Perspex (40 mm de diámetro), superpuestos con 2 capas de película de parafina extendida en las cuales se intercaló la dieta. Para los ensayos, se colocaron pulgones adultos *S. avenae* con la dieta artificial y se dejaron producir ninfas durante toda la noche. A continuación, se separaron los adultos y se mantuvieron las ninfas con la dieta durante 24 horas más. A continuación, se transfirieron 20 ninfas por tratamiento a cámaras de alimentación (10 por replicado) que contenían las dietas de ensayo. Se llevó un seguimiento de la supervivencia de los pulgones diariamente durante 10 días renovando la dieta según se requirió.

(vii) *Bioensayos de inyección: Moluscos: Babosa gris grande Deroceras reticulatum*

Se analizó omega/GNA/His en cuanto a su actividad contra babosas adultas (*D. reticulatum*) por inyección en babosas adultas (0,5 -0,7 g). Se enfriaron las babosas a 4 °C (durante aproximadamente 15 min) antes de la inyección de 50 µg o 100 µg de omega/GNA/His purificada re-suspendida en 25 µl PBS. Se evaluó al a mortalidad diariamente durante 7 días.

(viii) *Bioensayos de alimentación: molusco, babosa gris grande Deroceras reticulatum*

Para analizar los efectos de la ingestión, se alimentó a babosas jóvenes (10 – 40 mg) con discos de lechuga

revestidos con omega/GNA/His (1 mg/disco de hoja) o microgránulos de trigo que contenían omega/GNA/His purificada a una concentración de 1,3 -2,2 % p/p. Para los ensayos de microgránulos de trigo se añadió proteína de fusión liofilizada a harina de trigo tratada térmicamente (80 °C durante toda la noche). Se añadió agua a la mezcla (a 0,5 ml/g de peso seco) contenida en tapas Eppendorf y después se secaron al horno los microgránulos (50 °C durante aproximadamente 2 horas). Se prepararon microgránulos sin añadir proteína, tal como se ha explicado, y se utilizaron como tratamiento de control. Se utilizaron los microgránulos comerciales para comparar. Se seleccionaron babosas de pesos comparables (10-20 mg o 30-40 mg) y se las privó de alimento durante toda la noche a 15 °C, humedad relativa 65 %. A continuación, se colocaron cuatro replicados individuales de 5 babosas en discos Petri cubiertos de una toallita húmeda (para mantener la humedad) y se les proporcionó discos de hojas o microgránulos (colocados en botes de plástico para evitar la desecación) durante un período de 14 días. Se llevó un seguimiento de la supervivencia diariamente y se registraron los pesos el día 0, el día 7 y el día 14. Se cambiaron los microgránulos cada 5-6 días y se mantuvo la humedad por adición de agua. En los ensayos de disco de hoja se estimó el consumo por análisis de los discos de hoja escaneados utilizando un software J-image.

(viii) Análisis estadístico

Se llevó a cabo el análisis de todos los datos aplicando funciones estadísticas del GraphPad Prism 5.0. Se compararon curvas de supervivencia de insecto Kaplan-Meier utilizando las pruebas de rango logarítmico de Mantel-Cox. Se analizaron los pesos y los tamaños utilizando prueba t de Student o análisis de variancia en una vía (ANOVA). Se llevaron a cabo los análisis de las curvas de crecimiento por regresión no lineal, ajustada a un modelo de curva de crecimiento de Weibull. El nivel de significancia aceptado fue $P < 0,05$ en todos los casos.

RESULTADOS

Expresión y purificación de variantes de omega/GNA

Se verificaron clones que contenían genes de codificación de toxina omega ligados a GNA por secuenciación antes de la transformación en células deficientes de proteasa *P. pastoris*. Se seleccionaron los de mayor expresión por análisis de transferencia de western de cultivos a pequeña escala (utilizando anticuerpos anti-GNA). A continuación, se sobre expresaron todas las proteínas de fusión en fermentadores de laboratorio, los niveles de expresión de todas las versiones de proteínas de fusión que contenían omega fueron aproximadamente 40-50 mg/l. Se llevó a cabo la purificación desde los sobrenadantes de cultivo por afinidad con níquel o cromatografía de integración hidrófoba. En la Figura 2 se muestra el análisis SDS-PAGE representativo de las cinco variantes omega/GNA tras la purificación y liofilización. El análisis de transferencia de western de omega/GNA se presenta en la Figura 3. Tal como se muestra en la Figura 2, las tres versiones de proteína de fusión en las que la toxina omega está unida al extremo N de GNA presentan un grado de escisión proteolítica con dos bandas principales presentes en las fracciones purificadas. Las bandas de peso molecular mayor (aproximadamente 20 kDa) se acercan a los tamaños previstos para las tres variantes omega/GNA (15,93 – 16,77 kDa) y estas bandas se corresponden con proteína de fusión intacta, tal como lo confirma el análisis de transferencia de western de la Figura 3 que presenta una inmunoreactividad positiva de la proteína con anticuerpos de GNA y omega. Las proteínas de peso molecular inferior en la Figura 2 corresponden a GNA de la que se ha escindido péptido omega tal como lo demuestra la inmunoreactividad positiva de esta proteína con GNA, pero no con anticuerpos anti-omega. La relación de proteína intacta : escindida en las muestras difiere para las diferentes variantes de FP5. Para omega/GNA y omega/GNA/His la relación de proteína intacta : escindida es aproximadamente 1:2, mientras que la relación de omega modificada/GNA es aproximadamente 2:1. Por tanto, la modificación del péptido omega tiene como resultado un aumento de los niveles de proteína de fusión intacta que se puede obtener. Otros análisis han servido para observar que la estabilidad durante la fermentación es similar para omega/GNA y MOD.omega/GNA pero que la versión modificada es más estable que la forma no modificada durante el procesamiento en dirección 3'-

La purificación de variantes FP5 en las que el péptido omega está ligado al extremo C de GNA (His/GNA/omega y His/GNA/MODomega) tiene como resultado dos bandas de tinción principales en geles SDS-PAGE (Figura 2). El análisis de transferencia de western muestra inmunoreactividad positiva de ambas proteínas con anticuerpos anti-His lo que confirma que ambas bandas representan proteína recombinante que contiene etiqueta histidina N-terminal intacta (Figura 3). El análisis de transferencia de western en el que se utilizan anticuerpos anti-omega indica que ambas proteínas en muestras His/GNA-omega (que presentan las dos inmunoreactividad anti-omega positiva) representan proteína de fusión intacta con términos N procesados diferencialmente. En cambio, la proteína mayor en las muestras His/GNA-MODomega es inmunoreactiva con anticuerpos anti-omega, lo que indica que tiene lugar la escisión del péptido omega, con el resultado de una relación de proteína intacta a escindida para His/GNAMOD.omega de aproximadamente 1:1.

Actividad biológica

(i) Bioensayos de inyección: Mamestra brassicae (polilla de la calabaza)

En la Figura 4 se muestra la supervivencia registrada para larvas de *M. brassicae* a las que se inyectaron diferentes

dosis de omega/GNA; His/GNA/omega; MODomega/GNA; His/GNA/MOD.omega; y péptido omega en solitario. Las cuatro versiones de omega/GNA causan una mortalidad similar y significativa de las larvas en las dosis de inyección de 20 µg y 10 µg lo que indica que ni la orientación del péptido omega en relación con GNA ni la modificación de la secuencia omega alteran significativamente la actividad insecticida del péptido recombinante. La mortalidad observada para la proteína de fusión inyectada a los insectos es comparable (sobre una base molar) con la observada para los insectos a los que se les inyectó péptido omega, lo que indica que la unión de la toxina a GNA no comprometió la actividad de la toxina significativamente.

(ii) *Bioensayos de goteo: Mamestra brassicae*

Se alimentó con gotas que contenían omega/GNA larvas de *M. brassicae* en quinto instar para determinar si la proteína de fusión era tóxica por vía oral. En la Figura 5(A) se muestran datos de crecimiento de larvas representativos registrados de larvas alimentadas una vez al día con gotas que contenían 40 µg de omega/GNA. Mientras que la ingestión de la toxina omega solamente no presentó ningún efecto en el crecimiento de las larvas, se observa que la ingestión de la proteína de fusión omega/GNA causa una significativa reducción en el crecimiento de las larvas observándose un 40 % de mortalidad después de alimentar a las larvas diariamente con gotas durante 4 días. En la Figura 5(B) se muestra que las larvas alimentadas con una sola gota que contenía 40 µg de omega/GNA presentaron un crecimiento significativamente reducido en comparación con los controles durante un período de aproximadamente 6 días. El día 7, las larvas de control habían obtenido su peso máximo tras lo cual se observó una reducción del peso a medida que las larvas entraban en la fase de pupación (día 6-7). En cambio, las larvas alimentadas con omega/GNA presentaron un retraso en el crecimiento alcanzando el peso máximo el día 8-9, tras lo cual las larvas entraron en la fase de pupación. Se llevaron a cabo ensayos de goteo adicionales y se obtuvieron unos resultados comparables.

(iii) *Bioensayo de dieta artificial: Mamestra brassicae*

Se incorporaron omega/GNA y His/GNA/omega purificadas en dieta artificial a 500 ppm y se alimentó con ella larvas *M. brassicae* durante 12 días. Se alimentó con GNA a 100 ppm como tratamiento de control. En la Figura 6(A) y (B), respectivamente, se muestran la supervivencia y el peso de las larvas registrado. Se registró una significativa reducción del 85% en la supervivencia para las larvas alimentadas con dietas que contenían omega/GNA, pero no se observó ningún efecto en la supervivencia para insectos alimentados con dietas que contenían His/GNA/omega. De manera similar, las larvas alimentadas con omega/GNA presentaron una ganancia del peso limitada a lo largo del ensayo, mientras que los insectos alimentados con His/GNA/omega presentaron una ganancia de peso comparable a los controles (tratamientos de dieta con GNA y sin añadir proteína). Esto indica que la orientación de la toxina en relación con el vehículo es crítica para la actividad oral de la proteína de fusión omega/GNA para larvas de lepidópteros.

(iv) *Bioensayos contra larvas de Leptinotarsa decemlineata (escarabajo de la patata)*

Se llevó a cabo una serie de bioensayos para analizar los efectos de variantes de omega/GNA en la supervivencia de larvas de escarabajo de la patata y en el nivel de protección de la planta proporcionado por la proteína de fusión. En las Tablas 1, 2 y 3 se presentan datos representativos. En todos los casos, se observó una mortalidad de las larvas significativa y reducciones del daño de las plantas (véase Figura 7), para variantes de FP5, en las que estaba unida omega (modificada y sin modificar) al extremo N de GNA (es decir, omega/GNA; omega/GNA/His; MODomega/GNA/His a concentraciones de 350 ppm. Tal como se muestra en la Tabla 1, cuando se pulverizaron las plantas directamente tras la aplicación de las larvas, se observó normalmente un 100 % de mortalidad para tratamientos con omega/GNA, 5 días después del inicio del bioensayo. En estos ensayos el daño con respecto a las plantas de control fue 95 – 100 % (área de la hoja comida) mientras que las plantas pulverizadas con soluciones que contenían omega/GNA (+/- His tag) o MOD/omega/GNA puntuaron normalmente solamente 5-10 % para el área de la hoja consumida. En la Tabla 2 se muestran los datos comparativos de cuatro de las variantes omega/GNA y se puede observar que la unión de la toxina omega (versión modificada y sin modificar) con el extremo C de GNA tiene como resultado una pérdida de la actividad biológica contra esta plaga de coleópteros. Estos datos se representan gráficamente en la Figura 6. En los ensayos para analizar la persistencia en la proteína de fusión omega/GNA, se pulverizaron las plantas durante hasta 22 días (se presentan los datos de 11 días) antes de la aplicación de las larvas. En estos bioensayos, se observaron efectos similares en la supervivencia de las larvas y el daño de la planta que las plantas tratadas con proteína de fusión omega/GNA (en la que se une la toxina omega con el extremo N de GNA) (Tabla 3) en comparación con los ensayos en los que se evaluó la acción directa (Tablas 1 y 2). Esto indica que en condiciones de invernadero, la proteína de fusión omega/GNA tiene una actividad que persiste durante más de 3 semanas. Estos bioensayos han identificado la proteína de fusión omega/GNA, en la que la toxina omega está unida al extremo N de GNA, como candidato adecuado para el desarrollo como agente de control para plagas de coleópteros.

Tabla 1. Supervivencia y daño de la planta registrado para larvas de escarabajo de la patata alimentadas con plantas de patata pulverizadas con soluciones que contienen 350 ppm variantes omega/GNA (omega/GNA; omega/GNA/His; omega/GNA modificada). Se aplicaron en las plantas larvas de tres días de vida directamente antes de aplicar los tratamientos (n= 20 por tratamiento).

ACCIÓN DIRECTA							
Producto	Relación de aplicación (ppm)	2 DÍAS		4 DÍAS		5 DÍAS	
		% mortalidad	% hoja consumida	% mortalidad	% hoja consumida	% mortalidad	% hoja consumida
control	-	0	12	0	22	0	95
Omega/GNA	350	0	4	20	6	100	7
Omega/GNA/His	350	0	7	40	7	100	10
MODomega/GNA	350	0	6	15	6	95	10

5
Tabla 2. Supervivencia y daño de la planta registrado para larvas de escarabajo de la patata alimentadas con plantas de patata pulverizadas con soluciones que contienen 350 ppm de variantes de omega/GNA (omega/GNA/His; omega/GNA modificada; His/GNA/omega; His/GNA/MODomega). Se aplicaron a las plantas larvas de tres días de vida directamente antes de aplicar los tratamientos (n= 30 por tratamiento).

ACCIÓN DIRECTA							
Producto	Relación de aplicación (ppm)	2 DÍAS		5 DÍAS		6 DÍAS	
		% mortalidad	% hoja consumida	% mortalidad	% hoja consumida	% mortalidad	% hoja consumida
control	-	0	22	0	22	0	95
Omega/GNA/His	350	0	10	70	14	70	19
MODomega/GNA	350	6,67	6	100	6,67		
His/GNAomega	350	0	20	0	70	0	95
His/GNA/MODomega	350	0	17	0	72	0	92

10
Tabla 3. Supervivencia y daño de la planta registrado para larvas de escarabajo de la patata del Colorado alimentadas con plantas de patata pulverizadas con soluciones que contenían 350 ppm de variantes de omega/GNA (omega/GNA/His; MODomega/GNA). El hueco en blanco representa la adición de tensioactivo a la muestra. Se aplicaron las larvas de tres días de vida a las plantas 11 días después de los tratamientos. (n= 20 por tratamiento).

PERSISTENCIA 11 DÍAS									
Producto	Relac. aplic. (ppm)	13 DÍAS		15 DÍAS		18 DÍAS		20 DÍAS	
		% mort.	% hoja consum.						
control	-	0	30	0	75	0	100		
Omega/GNA/His	350	5	2	40	8	55	20		
MODomega/GNA	350	10	5	50	10	85	12		
Omega/GNA/His +blanco	350	0	2	30	12	55	18	60	40

15
(v) Bioensayos contra dípteros, mosca de bombilla del trigo *Delia coarctata*

20
Se analizó omega/GNA en cuanto a su actividad contra larvas de mosca de bombilla del trigo por exposición de los tallos del trigo, inyectados con concentraciones conocidas (10 y 20 µg) de proteína recombinante. Tal como se muestra en la Tabla 3, se observó una reducción de la supervivencia significativa y dependiente de la dosis para las larvas expuestas en los tallos inyectados con omega/GNA. Al cabo de 7 días de exposición, se registró un 50 % y un 100% de reducción en la supervivencia para las larvas expuestas a 10 y 20 µg de omega/GNA, respectivamente, en comparación con un 20 % de reducción de la supervivencia registrada para el tratamiento de control (sin añadir proteína).

25
Tabla 4. Supervivencia de larvas de mosca de bombilla (*Delia coarctata*) al cabo de 3 y 7 días de exposición a tallos de trigo que contienen 10 y 20 µg de omega/GNA recombinante.

Tratamiento (µg per ml)	N	vivas	mueras	% supervivencia
Supervivencia Día 3				
Control- agua	87	83	4	95,4

Omega/GNA (10 µg)	25	19	6	76
Omega/GNA (20 µg)	18	6	12	33,3
Supervivencia día 7				
Control-agua	85	68	17	80
Omega/GNA(10 µg)	24	12	12	50
Omega/GNA (20 µg)	18	0	18	0
Datos día 7 – adviértase que los valores n disminuyen porque algunos se pierden y se eliminan de la base de datos.				

(vi) Bioensayos contra homópteros, pulgones del cereal: Sitobion avenae

5 Se analizaron variantes de omega/GNA en cuanto a su actividad oral contra pulgones del cereal incorporándolas en la dieta artificial en una concentración de 0,5 mg/ml (500 ppm). Tal como se muestra en la Figura 8, las cuatro versiones analizadas de la proteína de fusión causaron reducciones significativas en la supervivencia en comparación con los tratamientos de control ($P < 0,0001$; Mantel-Cox) con 100 % de mortalidad registrada al cabo de 6 días de alimentación con dietas que contenían diferentes versiones de FP5. La mortalidad fue 100 % cuatro días después de la alimentación con variantes que contenían el péptido omega modificado (MODomega/GNA/His y His/GNA/MODomega) y 100 % 5 días y 6 días tras la alimentación con His/GNA omega y omega/GNA/His respectivamente. Esto indica que la posición de la toxina en relación con el vehículo no afecta significativamente a la actividad contra *S. avenae* pero que la modificación del péptido omega tiene como resultado una mayor actividad en comparación con el péptido sin modificar. GNA en esta concentración, en la dieta artificial, no produce ningún efecto significativo en la superficie de los pulgones del cereal.

(vii) Bioensayos de inyección: molusco, babosa gris grande Deroceras reticulatum

20 Tal como se muestra en la Figura 8, las inyecciones e omega/GNA/His en babosas adultas (*D. reticulatum*, 0,5 – 0,8 g) causaron una reducción de la supervivencia dependiendo de la dosis. La mortalidad fue significativamente más alta para las babosas a las que se les inyectaron 100 µg de omega/GNA en comparación con los controles (Chi-cuadrado $P < 0,0001$) y significativamente diferentes de las babosas a las que se les inyectaron 100 µg y 50 µg de proteína de fusión (Chi-cuadrado $P = 0,0015$).

(viii) Bioensayos de alimentación,

25 *Moluscos, babosa gris grande Deroceras reticulatum*

30 Para evaluar la actividad oral de omega/GNA/His sobre *D. reticulatum*, se alimentó a babosas jóvenes con discos de lechuga revestidos con proteína de fusión (re-suspendidos en agua). En la Figura 10 se muestra (A) el consumo de material de hoja estimado y (B) los pesos medios para los tratamientos de control y de proteína de fusión. Se observó una significativa reducción del peso medio para las babosas expuestas a proteína de fusión al cabo de 7 y 14 días de alimentación en comparación con los controles (prueba en t, $p < 0,05$). Asimismo, se redujo el consumo de material de hoja para las babosas alimentadas con proteína de fusión, con una significativa reducción en el consumo acumulativo, en comparación con los controles registrados 14 días tras el inicio del ensayo.

35 Se alimentaron también babosas jóvenes con microgránulos de trigo que contenían omega/GNA/His para analizar la actividad oral de la proteína de fusión. Antes de llevar a cabo estas pruebas, se demostró que la actividad y la estabilidad de la proteína de fusión eran estables al tratamiento térmico (evaluado por ensayo de inyección con lepidópteros y el análisis de transferencia de western). En la Figura 11 se muestran los pesos registrados para babosas (n=20 por tratamiento) expuestas a proteína de fusión (1,3 % p/p), control (microgránulos sin añadir proteína), o hambrientas, durante el tiempo que duró el ensayo. Se registró una significativa reducción del peso medio el día 7 y el día 14 para las babosas que habían sido alimentadas con proteína de fusión o las hambrientas (ANOVA; Prueba de Tukey $P < 0,05$) en comparación con el tratamiento de control.

45 En la Figura 12 se muestran los datos obtenidos de dos bioensayos en los que se agruparon las babosas el día 0 para la distribución del peso, de manera que se alimentaron babosas de 10-20 mg y 30-40 mg con microgránulos que contenía metaldehído comercial (2-3 % (p/p)); con microgránulos que contenían His/GNA/omega (2,2 % (p/p)); microgránulos de control (harina de trigo sin añadir proteína); o se mantuvieron hambrientas. La exposición a microgránulos que contenía metaldehído tuvo como resultado un 40 % de reducción de la supervivencia para el grupo de 10-20 mg, pero en el grupo de babosas más grandes de 30-40 mg no hubo reducción de la supervivencia. No se observó ningún efecto significativo de la supervivencia para ninguno de los grupos de babosas alimentadas con microgránulos de trigo que contenían proteína de fusión. Al cabo de 7 días, los pesos medios de las babosas que no se expusieron a dieta (hambrientas), microgránulos de metaldehído y microgránulos que contenían proteína de fusión presentaron reducciones significativas en comparación con el tratamiento con microgránulos de trigo de control (ANOVA; Prueba de Tukey $P < 0,05$). Los resultados de los bioensayos de disco de hoja y microgránulos de trigo demostraron que omega/GNA/His causa una significativa reducción en el crecimiento de babosas jóvenes debido a una significativa reducción del consumo de dietas que contienen proteína de fusión.

REFERENCIAS

- 5 Catterall, W.A., 2000, Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu. Rev. Célula Dev. Biol.* 16, 521-555.
- 10 Cino, J. 1999. High yield protein production from *Pichia pastoris*: a protocol for benchtop fermentation. New Brunswick Co. Inc. <http://www.nbsc.com/papers/Default.asp>.
- 15 Chong, Y., Hayes, J.L., Wen, S., Sollod, B.L., Hains, P.G., Hodgson, W.C., Broady, K.W., King, G.F., Nicholson, G.M., 2006, unpublished data. Cregg, J., Vedvick, T. & Raschke, W. (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bioengineering Technology* 11, 905-910,
- 20 Douglas, A.E., Prosser, W.A., 1992. Synthesis of the essential amino acid tryptophan in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) symbiosis. *Journal de Insect Physiology* 38, 565-568.
- 25 Fletcher' J.I., Smith, R., O'Donoghue, I.S., Nilges' M., Connor, M., Howden, M.E.H., Christie' M.J., King' G.F. (1997) The structure of a novel insecticidal neurotoxin, - atracotoxin-HV1, from the venom of an Australian funnel web spider. *Nature Struc. Biol.* 4, 559-566
- 30 Trung, N. Pham, Fitches, E., Gatehouse. J.A. (2006) a fusión protein containing a lepidopteran-specific toxin from the South Indian red scorpion (*Mesobuthus tamulus*) and snowdrop lectin shows oral toxicity to target insects. *BMC Biotechnol.* 6 -18.

Ejemplo 2: Proteínas de fusión ButalT expresadas en *Arabidopsis thaliana***Construcciones de expresión:**

30 Se utilizó el sistema de vector de entrada Gateway (Invitrogen) para generar construcciones para expresión de proteínas insecticidas en plantas transgénicas. Se ensamblaron construcciones que contenían secuencia de codificación de GNA madura y pre-péptido nativo ("líder") y proteínas de fusión que contenían la secuencia de codificación de GNA completa y una secuencia de codificación para la toxina del escorpión rojo (ButalT) en *E. coli* por técnicas de biología molecular normales y se verificó por secuenciación de ADN. Las proteínas de fusión contenían ButalT en las localizaciones tanto N-terminal como C-terminal en relación con GNA madura (ButalT/GNA y GNA/ButalT respectivamente). A continuación, se transfirieron las secuencias al vector de entrada del sistema Gateway en una orientación no codificante en relación con los sitios de recombinación Gateway. Se empleó el plásmido pK2WG7 de destino (diseñado para expresión no codificante) como vector final para la transformación de la planta para producir una secuencia codificante en la orientación correcta en relación con el promotor CaMV 35S. En la Figura 13 se ilustran las construcciones finales resultantes. No se optimizaron las secuencias de codón para *Arabidopsis*. Sin embargo, se utilizaron codones previamente optimizados para expresión de levadura que tiene preferencias de codón similares.

Transformación y selección

45 Se transformó cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 con las construcciones descritas. Se utilizó el método de inmersión floral utilizado para transformar plantas de tipo silvestre *Arabidopsis* (ecotype Columbia-1). Se esterilizaron superficialmente semillas de plantas sumergidas y se plantaron en placas de 0,5 x MS10 que contenían 50 µg/µl de kanamicina para selección de transformantes primarios (T₀).

Análisis de Expresión

50 La selección de transformantes en placas que contenían kanamicina tuvo como resultado transformantes 16, transformantes GNA, 45 transformantes GNA/ButalT y 48 transformantes ButalT/GNA. El análisis de transferencia de Western de transformantes primarios utilizando anticuerpos anti-GNA presentó la expresión de proteína extraña en 4 líneas de plantas transformadas con la construcción de GNA, 10 líneas de plantas transformadas con la construcción ButalT/GNA y 9 líneas de plantas transformadas con la construcción GNA/ButalT. En la fase T₂, se tomaron líneas que parecieron tener una alta expresión a lo largo de la fase T₃ para su uso para los bioensayos. Estas plantas fueron del original; líneas GNA 3 y 7, líneas ButalT/GNA 40 y 45 y líneas GNA/ButalT 5 y 32. En la Figura 3 se muestran los niveles de proteína expresión para las plantas utilizadas en los bioensayos. Se estimó que GNA (línea 3) (Figura 15A) contenía GNA en aproximadamente 0,15 – 0,2 % total de proteína soluble. Las líneas ButalT/GNA 40 y 45 (Figuras 15B y 15C) tuvieron un nivel de expresión para la proteína de fusión de aproximadamente 0,1 % total de proteína soluble. La expresión de proteína de fusión GNA/ButalT en la línea 5 (Figura 15D) estuvo también a un nivel de aproximadamente 0,1 – 0,15 % total de proteína soluble. Todos los transformantes generados parecieron tener unas características morfológicas y de desarrollo normales.

65

Efecto de proteínas de fusión de expresión de *Arabidopsis* transgénica cuando se dan como alimento a polilla del tomate (*Lacanobia oleracea*)

Se colocaron 20 larvas de *Lacanobia oleracea* neonatas en tuestos (4 replicados, 5 larvas por tuesto) y se permitió que se alimentaran de las hojas desprendidas de las plantas de *Arabidopsis* transgénica. Se midió la supervivencia a lo largo de un período de 14 días y se midieron los pesos en los días 11 y 14. Se repitieron los ensayos dando un total de número de muestras de 40. Los tratamientos utilizados fueron control, proteína de fusión que expresa GNA, proteína de fusión que expresa ButalT/GNA y proteína de fusión que expresa GNA/ButalT. Se utilizaron dos líneas independientes de que expresaban proteína de fusión ButalT/GNA (líneas 40 y 45).

Se observó que la supervivencia era significativamente diferente entre los insectos de control (93 % de supervivencia) y la línea de 40 ButalT/GNA (65 % de supervivencia) (pruebas Mantel-Cox, $P = 0,0002$) y también entre GNA (línea 3) (90 % supervivencia) y ButalT/GNA (línea 40) (pruebas Mantel-Cox, $P = 0,0074$). No hubo ninguna diferencia significativa en la supervivencia entre GNA y los tratamientos de control (pruebas de Mantel-Cox, $P = 0,5552$). No hubo diferencia en el peso medio entre los tratamientos (prueba T de Student, $P > 0,05$ en todos los casos) (Figura 16). Para la segunda línea ButalT/GNA analizada (45) hubo una tasa de supervivencia del 70 % (Figura 17). También en este caso es significativamente diferente del control (pruebas Mantel-Cox, $P = 0,0015$).

En contraposición a las plantas que expresan ButalT/GNA, la línea de expresión de the GNA/ButalT no causó mortalidad de insectos significativa. La diferencia en la supervivencia observada entre el control y GNA/ButalT (85% supervivencia) no es significativa (prueba de Mantel-Cox, $P = 0,2889$). Tampoco hay ninguna diferencia significativa en la supervivencia entre GNA y GNA/ButalT (Pruebas de Mantel-Cox, $P = 0,6153$). En este ensayo, las plantas que expresan GNA afectaron negativamente al crecimiento de insectos. Para ambos días 11 y 14, no hubo una reducción significativa en el peso medio (aproximadamente 50 %) entre los tratamientos de control y GNA. (Prueba T de Student $P < 0,05$). Las plantas que expresaron proteínas de fusión también presentaron un efecto en el crecimiento de insectos, pero la reducción fue menor (aproximadamente 20 %). Hubo una significativa diferencia en los pesos observados el día 11 entre el control y ButalT/GNA (prueba T de Student $P < 0,05$) pero no el día 14 ($P = 0,072$). El día 11 no hay ninguna diferencia significativa en el peso entre el control y GNA/ButalT (Prueba T, $P = 0,05$), sin embargo, el día 14 hay una diferencia significativa ($P < 0,05$).

Las comparaciones de los pesos medios en ambos días entre GNA y ButalT/GNA y GNA/ButalT presentan una diferencia significativa ($P < 0,05$). Entre GNA/ButalT (45) y ButalT/GNA (5) la diferencia en peso no es significativa para ninguno de los días ($P > 0,05$).

Conclusiones

1. Las plantas que expresan la proteína de fusión ButalT/GNA (FP4) presentaron un sólido efecto en la mortalidad de larvas neonatas de polilla del tomate (*L. oleracea*) con una disminución de la supervivencia del 30 %, en comparación con los controles. Las plantas que expresaban proteínas de fusión GNA o a GNA/ButalT no tuvieron ningún efecto en la mortalidad de las larvas. Estos resultados son coherentes con los resultados obtenidos cuando se incluye la proteína recombinante purificada en la dieta artificial de alimentación. Los resultados se suman como una prueba más del concepto de que las proteínas de fusión insecticidas se pueden producir en plantas transgénicas y que cuando se hace así, se retiene la actividad insecticida del producto transgénico.

2. Mientras que GNA tiene un efecto inhibitor en el crecimiento de las larvas en condiciones en las que las larvas se están desarrollando con rapidez (segundo ensayo), las proteínas de fusión tienen solamente efectos inhibidores marginales. Esto indica, tal como se ha demostrado previamente, que el efecto inhibitor del crecimiento de GNA en larvas de lepidópteros depende de la actividad de aglutinación, ya que las proteínas de fusión tienen una actividad de aglutinación reducida en comparación con la lectina recombinante.

Ejemplo 3

Bioensayos de toxicidad de His/GNA/MODomega (FP5) y Galanthus nivalis Aglutinina (GNA) en abejas (pruebas orales y de contacto)

Se llevaron a cabo ensayos de toxicidad aguda oral y de contacto utilizando abejas obreras adultas (*Apis mellifera*), de acuerdo con la guía OECD (1998a, 1998b). Se recogieron abejas de un solo enjambre sano en Newcastle University, en junio de 2011 y agosto de 2011. En cada ensayo, se utilizó acetamiprid como control positivo en tres concentraciones que cubrieron la LD₅₀ para toxicidades oral y de contacto. Se utilizaron concentraciones de GNA o FP5 de 100 µg/abeja y 20 µg/abeja para bioensayos oral y de contacto, respectivamente. Se utilizaron seis replicados de diez abejas para cada tratamiento en ensayos orales y siete replicados de 10 abejas en ensayos de contacto. Tras los análisis de Kaplan-Meier, FP5 y GNA presentaron niveles de toxicidad aguda oral bajos contra abejas (LD₅₀ >100 µg/abeja; Fig. 18). No se detectaron efectos significativos FP5 o GNA en ensayos de toxicidad de contacto (Fig. 19).

Asimismo, se realizó un bioensayo de inyección. Se inyectaron abejas (tres replicados de diez abejas para cada

tratamiento) con 20 µg de GNA y FP5 en 5 µl de tampón PBS utilizando una jeringuilla Hamilton®. Se utilizó tampón solamente como control negativo.

5 Se registró la mortalidad a las 4 horas, 24 horas y 48 horas del inicio de la prueba. Todos los tratamientos difirieron significativamente entre sí, presentando GNA una mayor toxicidad que FP5.

10 Los bioensayos llevados a cabo siguieron la guía OECD en cuanto a los efectos de plaguicidas sobre las abejas. A una mayor concentración recomendada para la prueba oral (100 µg/abeja), FP5 y GNA presentaron menores efectos de mortalidad que acetamiprid, que según se ha notificado tiene una baja toxicidad en las abejas (Laurino et al., 2011). Por otra parte, ni FP5 ni GNA presentaron efectos en los bioensayos de contacto.

Para los bioensayos de inyección, FP5 tuvo una menor toxicidad que GNA, produciéndose mortalidad al cabo de 24 horas y 48 horas. En suma, los resultados indican que FP5 y GNA tienen una baja toxicidad sobre las abejas.

15 Laurino, D.; Porporato, M.; Patetta, A. y Manino, A. Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees: laboratory tests. *Bulletin of Insectology*, 64(1): 107-113, 2001.

20 OECD. Guidelines for the testing of chemicals. Honeybees, Acute Oral Toxicity Test. Document number 213. 1998a. OECD. Guidelines for the testing of chemicals. Honeybees, Acute Contact Toxicity Test. Document number 214. 1998b.

Ejemplo 4

Bioensayos de alimentación: molusco babosa gris grande *Deroceras reticulatum*

25 Para analizar los efectos de la ingestión, se alimentó a babosas jóvenes (70-80 mg) con microgránulos de trigo que contenían proteína purificada de MODOmega/GNA/His a una concentración de 0-5 % p/p. Para el ensayo de microgránulos de trigo, se añadió proteína de fusión liofilizada a la harina de trigo tratada con calor (80 °C durante toda la noche). Se añadió agua a la mezcla (a 0,5 ml/g de peso en seco) contenida en una tapa Eppendorf y después se secaron en horno los microgránulos (50 °C durante aproximadamente 4 horas). Se prepararon microgránulos sin añadir proteína como se ha descrito y se utilizaron como tratamiento de control. Los tratamientos adiciones fueron hojas de lechuga y ausencia de dieta (tratamiento de control negativo). Se seleccionaron babosas de pesos comparables y se privaron de alimento durante toda la noche a 15 °C, humedad relativa 65 %. A continuación, se colocaron cuatro replicados individuales de 4-5- babosas en discos Petri alineados con una toallita mojada (para mantener la humedad) y se les proporcionó discos de hojas o microgránulos (se colocaron sobre botes de plástico de peso para evitar la desecación) durante un período de 14 días. Se llevó un seguimiento de la supervivencia diariamente y se registraron los pesos el día 0, el día 7 y el día 14. Se cambiaron los microgránulos cada 5-6 días y se mantuvo la humedad por adición de agua.

40 Ejemplo 5

Generación de varios copias de clones de expresión superior de MODOmega/GNA/His

Sección 1 Generación de construcciones que contienen varias copias de genes que codifican FP5

45 1.1. Generación de construcciones de expresión

50 Se utilizó el vector de expresión de *Pichia* de Invitrogen pGAPZαB (véase Fig. 21A) para generar clones que contenían varios casetes de FP5. Se clonó la secuencia codificante de FP5 entre los sitios *PstI* y *XbaI* para preparar un casete de expresión inicial que consistió en la región de promotor GAP, secuencia de codificación de FP5 (que contenía etiqueta histidina C-terminal) y secuencia de terminación AOX (Figura 21B). El vector de expresión requirió modificación para permitir la posterior inserción de los varios casetes de FP5 en el genoma de levadura. La transformación convencional requiere linealización del vector con *BlnI* para estimular la recombinación homóloga. El sitio no puede utilizarse para linealización de plásmidos que contienen varios casetes de FP5 ya que *BlnI* está presente en todos los casetes FP5. Por tanto, se añadió un sitio *HindIII* a una distancia 45 pb del sitio *BlnI* original en el extremo 3' del vector utilizando técnicas moleculares convencionales (Fig. 21C). El sitio *HindIII* permite la linealización de plásmidos (sin pérdida de casetes FP5) antes de la transformación de *Pichia*.

60 A continuación, se generaron construcciones que contenían 2, 3, 4, 5, 7 y 11 casetes FP5 utilizando técnicas de digestión de restricción y ligación convencionales.

Transformación de construcciones (SMD y X33)

65 Se transformaron plásmidos linealizados de una copia, 3 copias, 5 copias, 7 copias y 11 copias (*Hind III*) en cepa de *Pichia* SMD 1168H (deficiente en proteasa) aplicando los protocolos del kit de Invitrogen convencionales. Para las transformaciones de la cepa X33 solamente se transformó un plásmido de 11 copias. Se seleccionaron los

transformantes en placas que contenían antibiótico (100 µg/ml zeocina).

Determinación del número de copias por metodología de q-PCR:

5 Se cultivaron clones de levadura seleccionados (mínimo de 5 clones por número de copias) en 10 ml YPG en matraces con tabique deflector a 30 °C durante 72 horas. Se extrajo ADN genómico (ADNg) según Marko *et al.* (2011) y se cuantificó utilizando Nanodrop. Se preparó una reserva de 10 ng/ul para todas las muestras. Se diseñaron cebadores específicos de gen para ampliar una secuencia parcial de FP5 utilizando el software Primer Design adecuado para máquinas de PCRc de Applied Biosystem y reactivos SYBR (cyber Green). Se utilizó el gen actina como control endógeno para el nivel de expresión de gen. Se utilizaron 50 ng de ADNg como matriz para las PCRc. Se comparó el número de copias de FP5 con SMD sin transformar y un clon *Pichia* de una copia (que se seleccionó como la mínima amplificación en transformación de 1 copia, aunque algunos clones de 1 copia presentaron 2 copias debido a la doble integración).

15 Se utilizaron los siguientes cebadores para la PCRc:

Para amplificación de FP5: Directa 5'TGGTCTCTCCCGTAGCTGCTT (SEQ ID No: 18) Inversa 5'ATCGAACAAACCGATTTGGG (SEQ ID No: 19)

20 Para amplificación de actina: Directa 5' CGGTATGTGTAAGGCCGGATA (SEQ ID No: 20) Inversa 5'ACGACCGATGGGAACACTGT (SEQ ID No: 21)

Determinación del número de copias por PCRc: Resultados

25 Se analizaron al menos 5 clones de levadura por número de copias por triplicado por PCRc. Los datos representativos presentados en la Fig. 22 demuestran que la transformación de *Pichia* con plásmidos de varias copias no tiene como resultado que todos los clones contengan el mismo número de casetes de FP5. Se demostró que todos los clones de levadura transformados de varias copias contenían diferentes números de copias (p.ej., el plásmido de 5 copias demostró la presencia de 1 copia, 2 copias y 5 copias) lo que indica no está garantizada una completa integración del ADN de plásmido en el genoma de levadura. Cabe destacar que un clon derivado de una transformación de 5 copias demostró la presencia de 8 copias y se pensó que esto se debió a una integración completa y una parcial (5 + 3) de ADN. Para SMD, entre los clones rastreados transformados con un plásmido de 11 copias solamente uno demostró contener 11 copias del casete FP5. Se observó que los clones X33 transformados con un plásmido de 11 copias contenían 1, 2, 4, 5, y 8 casetes de FP5.

35 *Exploración a pequeña escala*

Tras el análisis de PCRc, se analizaron clones seleccionados en cuanto a la expresión de proteína en cultivos de YPG a pequeña escala (10 ml). Después del cultivo a 30 °C durante 48 horas, se centrifugaron los cultivos y se cargaron las muestras de sobrenadante (en ebullición en presencia de tampón de muestra SDS; 312,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 10 % SDS (w/v), 10 % de β-mercaptoetanol (v/v), 50 % glicerol (v/v), 0,01 % azul de bromofenol (p/v)) en geles de SDP-PAGE junto con patrones de GNA. Se transfirieron las proteínas en nitrocelulosa utilizando un sistema de electrotransferencia semiseca ATTO HorizBlot y se sondeó con anticuerpos anti-GNA policlonales (dilución 1:3300 en polvo lácteo al 5 %; PBS; 0,1 % Tween 20). Se detectaron señales quimioluminiscentes en película de rayos X médica Fuji seguido de 1 minuto de incubación con reactivo de detección (1M Tris-HCl pH 8,5, 0,2 mM ácido cumárico, 1,25 mM luminol, 0,006 % (v/v) peróxido de hidrógeno).

En términos generales, cuando se comparan los resultados obtenidos del análisis de transferencia de Western a pequeña escala de los niveles de expresión con los resultados de la PCRc, se puede observar que los niveles de expresión se corresponden aproximadamente con el número de copias presentes en los clones de levadura analizados (Fig. 23: es decir, los clones que contienen 1-3 copias presentan una menor expresión en comparación con los que contienen > 3 copias). Sin embargo, la expresión de FP5 en cultivos a pequeña escala no es directamente proporcional al número de casetes de FP5 integrados. Se cree que esto se debe a las diferencias de parámetros, como el nivel de oxígeno en los cultivos a pequeña escala. En consecuencia, se seleccionaron los clones para fermentación en laboratorio basada en los resultados de la PCRc. En la Fig. 24 se muestran los resultados de PCRc. para clones seleccionados para comparación de niveles de expresión por fermentación de laboratorio.

Sección 2: Fermentación a escala de laboratorio de clones seleccionados y estimación de rendimiento

60 Se seleccionaron clones que contenían más de una copia del casete de expresión FP5 para fermentación de laboratorio. El número de copias se basó en el análisis de PCRc descrito en la sección 1 (Fig. 24). Se llevaron a cabo nueve ciclos de fermentación en un fermentador de laboratorio BioFlo 7,5 I (New Brunswick).

Métodos

Parámetros de fermentación

5 Se llevaron a cabo todos los ciclos en un recipiente de fermentación BioFlo 110 de 5 litros (New Brunswick) con 2,5 litros de medio salino basal (suplementado con sales PTM1). Se sembraron los fermentadores con 180 ml de inóculo YPG (a no ser que se indique de otra forma), se cultivó a 30 °C durante 72 horas. Se alimentó con 1,25 litros de glicerol estéril (50 % v/v) durante un período de fermentación de 72 horas. El punto de referencia de oxígeno disuelto de 30 % (rpm 250 – 750 de fluctuación), pH 4-4,5 en el inicio se elevó a 4,7-4,9 al cabo de 5 horas de la inoculación, se mantuvo la temperatura a 30 °C en todo el período.

Análisis de rendimiento y contenido de FP5 en muestras liofilizadas

15 Se obtuvieron las estimaciones del rendimiento tras la fermentación de clones seleccionados por análisis SDS-PAGE y transferencia de Western (utilizando anticuerpos anti-GNA). La transferencia de Western da una evaluación más precisa del rendimiento debido a la escasa tinción de azul de Coomassie del componente omega de FP5 recombinante en geles SDS-PAGE.

20 Para el análisis SDS-PAGE, se desalaron muestras de cultivo pasando a través de ellas concentradores de centrífuga (Vivaspin 30 000 o 50 000 MWCO) antes de la adición de 5x tampón de muestra SDS y ebullición (10 minutos). A continuación, se cargaron las muestras en 17,5 % de mino-geles de acrilamida junto con marcadores de peso molecular (Sigma SDS-7) y patrones GNA. Se tiñeron los geles para el total de proteínas con azul de Coomassie y se realizó una estimación a simple vista del contenido de proteína. Para el análisis de transferencia de western, se diluyen muestras en agua destilada antes de cargarlas en geles SDS-PAGE junto con patrones de GNA (tal como se describe en la sección 1,4).

Resultados

Fermentación: crecimiento de cultivo

30 La Figura 25 presenta absorbancia representativa (D.O. 600 nm), el peso del microgránulos en húmedo y las tasas de alimentación de glicerol para clones seleccionados de FP5 cultivados en fermentadores de laboratorio en las condiciones especificadas. Los aumentos similares en la absorbancia y los pesos del microgránulos en húmedo con el tiempo para los diferentes clones indican claramente que el crecimiento de la célula no se reduce en cepas que llevan más de un casete de FP5 y hasta 8 casetes de FP5. El crecimiento de la célula (representado por D.O y el peso del microgránulos en húmedo) fue el máximo para el clon X33 de 8 copias en comparación con el crecimiento de clones SMD transformados. Se sabe que la cepa X33 de tipo silvestre es una cepa más robusta y que crece más rápido en comparación con la cepa SMD1168H deficiente en proteasa.

Fermentación: análisis de rendimiento

45 En la Fig. 26 (SDS-PAGE) y en la Fig. 27 (análisis de Western) se muestra el análisis representativo de sobrenadantes de cultivo derivados de la fermentación de laboratorio. Los datos previos obtenidos de la fermentación de clones SMD que contienen un solo casete de expresión de FP5 (se muestran los resultados de varios ciclos de fermentación) determinaron un rendimiento basal de 100 mg/litro de sobrenadante de cultivo. Tal como se ha señalado anteriormente y se muestra en la Fig. 26, el componente péptido omega de FP5 tiñe escasamente geles SDS-PAGE utilizando tinte de Coomassie, mientras que el análisis de transferencia de Western es un método más sensible para predecir la cantidad de proteína (Fig. 27). Es evidente que aumentar el número de casetes de FP5 tiene como resultado un aumento de la producción de las proteínas de fusión FP5. Por otra parte, aumenta el crecimiento y la expresión en los clones X33 de tipo silvestre en comparación con los clones SMD1168H deficientes en proteasa. Anteriormente, SMD1168H era la cepa por la que se optaba para la expresión de proteínas de fusión, ya que la expresión en X33 tiene como resultado un producto más escindido. En el caso de FP5 (MODomega/GNA/His) no se observó ningún descenso significativo de la producción de proteína de fusión intacta para la cepa de expresión X33 en comparación con la cepa SMD1168H. En la Tabla 5 se muestra un compendio de los ciclos de fermentación llevados a cabo durante el período registrado.

55 Hasta la fecha, el nivel de expresión máximo conseguido es aproximadamente 1 g/litro de sobrenadante de cultivo obtenido del clon X33 que lleva 8 copias del casete FP5. Se puede observar en la Fig. 26 para cepas de expresión superior que FP5 y GNA escindido representan más de un 50 % del total de proteína en el sobrenadante de cultivo. No está claro si esto es el límite para la expresión de esta proteína de fusión utilizando los procedimientos actuales. Debe señalarse que un solo ciclo de fermentación con un clon SMD de 11 copias no tuvo como resultado un alto rendimiento.

Ejemplo 7**Actividad oral de Hv1a/GNA contra larvas de *Mamestra brassica****Ensamblaje de construcción de gen sintético y proteína de fusión*

5 Se ensambló un gen sintético que codifica la secuencia de aminoácidos de Hv1a madura utilizando una serie de oligonucleótidos de solapamiento, optimizando el uso de codón para la expresión en levadura (Tabla 5). Tras el ensamblaje, se amplió la secuencia de codificación por PCR y se ligó en un vector de expresión de levadura (derivado de pGAPZαB) que contenía una secuencia de codificación de polipéptido GNA maduro (restos de aminoácido 1-105). Se fusionó el péptido Hva de 37 restos con el extremo N- de GNA a través de una secuencia de engarce tri-alanina tal como se representa en la Fig. 28(A). Se clonó la construcción Hv1a/GNA de manera que la prepro-secuencia de factor α de levadura N-terminal dirigiera la proteína expresada a la ruta de secreción de levadura. Se prevé que la proteína de fusión Hva1/GNA final contenga dos restos alanina adicionales en el extremo N (tras la eliminación de la prepro-secuencia) y que termine en el resto 105 de la proteína GNA madura, dando una masa molecular prevista de 16.36 kDa. Se clonó la construcción Hv1a/GNA-pGAPZαB en *E. coli* y se verificó la secuencia codificante por secuenciación de ADN.

20 Tabla 5 Detalles de fermentación de clones de expresión de FP5 de *Pichia* seleccionados. El número de copias se designa de acuerdo con el análisis de PCRc (sección 1) Para la columna en la que se indica el número de clon y la cepa, el número que está entre paréntesis es el del número de copias de la construcción utilizada para la transformación de *Pichia* (SMD es proteasa deficiente y X33 es una cepa de tipo silvestre). n/a se refiere a no analizado.

No. de ciclo	No. de copias FP5 (PCRc)	No. Clon	Volumen final de cultivo (litros)	Densidad celular final en húmedo (µg/ml)	Rendimiento estimado (µg/l)
X(valor basal)	1	4 (1c/SMD)	2,4	325	100
1	2	3 (1c/SMD)	2,7	316	200
3	5	5 (5c/SMD)	2,55	386	600
4	5	3 (7c/SMD)	2 (rebalse)	455	600
5	5	2 (11c/SMD)	2,4	205	n/a
6	2	3 (11c/SMD)	2,4	375	200
7	11	7 (11c/SMD)	2,4	365	200
8	8	1 (11c/X33)	2,4	420	1000
9	8	2 (5c/SMD)	2,4	350	600

25 Expresión y purificación de proteína de fusión Hv1a/GNA recombinante

Se linearizó ADN de clon Hv1a/GNA-pGAPZαB verificado, se transformó en cepa *P. pastoris* deficiente en proteasa SMD1168H y se seleccionó en placas que contenían antibiótico. Se analizaron diez clones para la expresión de proteína recombinante por transferencia de Western (utilizando anticuerpos anti-GNA) de sobrenadantes derivados de cultivos a pequeña escala (no se muestran los resultados). Esto permitió la selección del clon de mejor expresión para la producción de proteína de fusión por fermentación de laboratorio.

35 Para la producción de proteína de fusión, se cultivaron células de *P. pastoris* en un fermentador de laboratorio BioFlo 110. Se expresó GNA recombinante y se purificó, tal como se ha descrito anteriormente (*Trung NP, 2006*). Se purificó la proteína de fusión Hv1a/GNA desde un sobrenadante de cultivo aclarado por cromatografía de interacción hidrófoba seguido de una segunda etapa de filtración con gel para eliminar las proteínas de levadura contaminantes de alto peso molecular. Se recuperaron dos proteínas principales de ~20 kDa y ~14.5 kDa tras la fermentación y purificación de Hv1a/GNA recombinante (Fig. 28B). La proteína de 20 kDa se desplaza a un peso molecular superior al esperado con respecto a 16,36 kDa previstos para la proteína de fusión intacta. Sin embargo, el análisis de transferencia de Western (Fig. 28C) utilizando anticuerpos anti-GNA y anti-HV1a confirmó que la proteína de peso molecular superior representa la proteína de fusión intacta ya que es inmuno-reactiva contra ambos anticuerpos anti-GNA y anti-HV1a. La banda de peso molecular más bajo, que no muestra inmuno-reactividad positiva con anticuerpos anti-HV1a representa GNA de la que se ha escindido péptido Hv1a. El análisis de las muestras tomadas durante la fermentación confirmó que la escisión de la proteína de fusión tiene lugar durante la expresión y no durante la purificación (no se muestran los resultados). La proteína de fusión Hv1a/GNA intacta fue expresada a niveles de ~50 mg/l de sobrenadante de cultivo. La relación entre proteína de fusión intacta y GNA escindida fue coherentemente 2:1 tal como se juzgó por geles SDS-PAGE y transferencia de Western.

50 Toxicidad de inyección de Hv1a /GNA y Hv1a

Se verificó la actividad biológica de Hv1a/GNA por inyección de 5-20 µg de proteína de fusión purificada en larvas de *M. brassicae* en quinto estadio (40-70 mg). Se realizaron inyecciones de cantidades molares comparables de Hv1a

recombinante (2,3-9,2 µg). Se produjo la mortalidad de las larvas durante un período de 4 días (Tabla 7) si bien se observó predominantemente durante las primeras 48 horas tras la inyección.

Las larvas a las que se les inyectó una dosis mayor de proteína de fusión (10 µg y superior) o toxina solamente (4,6 µg y superior) presentaron síntomas de parálisis y se redujo significativamente la supervivencia en comparación con el tratamiento de control (curvas de supervivencia Kaplan-Meier; pruebas de rango logarítmico Mantel-Cox; $P < 0,001$). Los niveles de mortalidad fueron comparables entre los tratamientos de proteína de fusión inyectada y de toxina inyectada (p.ej. 80 % de la mortalidad para las larvas a las que se inyectaron 92 µg de toxina /g de insecto en comparación con 90 % de mortalidad para larvas a las que se inyectaron 100 µg de toxina como componente de proteína de fusión/g de insecto).

Toxicidad oral de Hv1a/GNA y Hv1a

Se realizaron varios experimentos para valorar si la fusión con GNA era capaz de mejorar la toxicidad oral de Hv1a. En primer lugar, se alimentaron larvas de *M. brassicae* en el quinto estadio diariamente durante cuatro días con gotas que contenían 40 µg de proteína de fusión purificada o 9,6 µg de Hv1a (Fig. 29A). Se observó que la ingestión de un goteo diario de proteína de fusión tuvo como resultado un cese completo de la alimentación de las larvas, siendo prueba de ello la significativa reducción del peso medio registrado para este tratamiento en comparación con el grupo de control. Al cabo de cuatro días, el 40 % de las larvas tratadas estaban muertas y los insectos que quedaron no sobrevivieron a la pupación. En llamativo contraste, no se observó ninguna reducción del crecimiento de las larvas en comparación con el tratamiento con BSA de control para las larvas alimentadas con gotas que contenían Hv1a lo que indica que la toxicidad oral de Hv1a se potencia de forma espectacular con la fusión con GNA.

En un segundo ensayo, se alimentó a larvas en el cuarto estadio con una sola gota que contenía 40 µg de Hv1a/GNA (Fig. 29B) y se demostró que causaba una reducción del crecimiento de las larvas en comparación con las larvas alimentadas con control durante un período de aproximadamente seis días. El día 7, las larvas de control habían alcanzado su peso máximo tras lo cual se observó una reducción del peso a medida que los insectos entraban en la fase pre-pupación (día 6-7). En cambio, las larvas que habían ingerido una sola gota con contenido de Hv1a/GNA presentaron una menor velocidad de crecimiento alcanzando su peso máximo el día 8-9, tras lo cual las larvas entraron en fase de pupación.

Se investigó además la toxicidad oral de la proteína de fusión Hv1a/GNA alimentando larvas de *M. brassicae* en segundo instar con discos de calabaza revestidos con proteínas recombinantes purificadas, un ensayo que podría ser más representativo de las situaciones en las que se emplea Hv1 en cultivos como bioinsecticida foliar. Se redujo significativamente la supervivencia de las larvas cuando se alimentó a los insectos con discos revestidos con Hv1a/GNA (Fig. 30), de manera que quedó un 15 % y 20 % de larvas al cabo de 10 días de exposición a los discos revestidos con Hv1a/GNA a concentraciones de 0,2 % p/p y 0,1 % p/p, respectivamente. En cambio, se registró un 80 % de supervivencia para las larvas criadas durante 10 días con discos revestidos con 0,2 % p/p de GNA, que no fue significativamente diferente del 90 % de supervivencia registrado para el tratamiento de control (sin añadir proteína). Las curvas de supervivencia del tratamiento con fusión de proteína fueron significativamente diferentes tanto para los tratamientos de GNA como los de control (Kaplan-Meier; Pruebas de rango logarítmico Mantel-Cox; $P < 0,001$). La exposición a discos revestidos con Hv1a/GNA también retardó el crecimiento larval en las larvas supervivientes. La reducción del crecimiento dependió de la dosis, de manera que el día 7, el peso promedio de las larvas supervivientes alimentadas con 0,2 % o 0,1 % p/p de Hv1a/GNA se redujo en un 90 % y 76 % respectivamente, en comparación con el tratamiento de control. Se demostró asimismo que GNA había reducido el crecimiento larval, de manera que el día 7 el peso promedio de las larvas alimentadas con 0,2 % p/p de GNA se había reducido en un 45 % en comparación con el tratamiento de control.

Suministro de Hv1a/GNA ingerido al sistema circulación y unión de Hv1a/GNA y GNA inyectados al cordón nervioso central

Para determinar si los efectos tóxicos observados en bioensayos orales se podían atribuir al suministro de Hv1a mediado por GNA al sistema circulatorio de larvas de *M. brassicae*, se extrajo la hemolinfa de los insectos alimentados con dietas que contenían Hv1a/GNA y se analizaron en cuanto a la presencia de proteína de fusión por transferencia de Western utilizando anticuerpos anti-GNA. Una transferencia representativa, representada en la Fig. 31(A) confirma la inmuno-reactividad de una banda principal que corresponde al peso molecular de proteína de fusión intacta en las muestras de larvas alimentadas con Hv1a/GNA, pero no insectos de control. Tal como se ha mostrado anteriormente en la Fig. 38C, las muestras de proteína de fusión contienen dos bandas inmunorreactivas con GNA que corresponden a la proteína de fusión intacta y GNA de la que se ha escindido el péptido Hv1a. Por tanto, la presencia de una segunda banda inmunorreactiva más pequeña en las muestras de hemolinfa de las larvas alimentadas con proteína de fusión indica la absorción tanto de Hv1a/GNA intacta como GNA escindida, o la escisión de proteína de fusión intacta tras la absorción en el intestino del insecto. La reactividad cruzada y la escasa sensibilidad de los anticuerpos anti-Hv1a no permitió la detección de la proteína de fusión o la toxina cuando se utilizaron estos anticuerpos para sondear transferencias de Western de hemolinfa de larva.

Estos resultados indican que la principal razón de la mejor actividad oral de Hv1a cuando se fusiona con GNA es la capacidad de esta lectina para mediar el suministro de Hv1a a la hemolinfa del insecto. Sin embargo, surge la pregunta de si GNA podría ser capaz también de mejorar el suministro de Hv1a a sus sitios de acción en el sistema nervioso del insecto. Para investigar si GNA es capaz de unirse al tracto nervioso de larvas de lepidópteros, se diseccionaron cordones nerviosos intactos de insectos a los que se habían inyectado GNA o Hv1a/GNA y se analizaron por transferencia de Western utilizando anticuerpos anti-GNA. Se agruparon las muestras de cordones nerviosos y hemolinfa de 3-6 insectos, se extrajeron normalmente 3-12 horas después de la inyección de 10-20 µg de GNA o Hv1a/GNA. En la Fig. 31B se muestra la inmuno-reactividad positiva de bandas que corresponden en tamaño a GNA y proteína de fusión Hv1a/GNA intacta, tanto en las muestras de cordón nervioso como de hemolinfa, de insectos inyectados, lo que indica que GNA es capaz de unirse al tracto nervioso de larvas de lepidópteros. No se observaron bandas que corresponden a GNA o proteína de fusión Hv1a/GNA en el tejido nervioso extraído de insectos a los que se alimentó con GNA o Hv1a/GNA (a 2,5 mg/5 g peso de dieta en húmedo), presumiblemente debido a que los niveles de proteína unida estaban por debajo de los límites de detección de anticuerpos anti-GNA.

Se buscaron más pruebas de la capacidad de GNA de unirse al cordón nervioso central por visualización de los cordones nerviosos diseccionados de insectos que habían sido inyectados o alimentados con GNA o Hv1a/GNA marcados con fluorescencia. Los tratamientos de control fueron ovalbúmina marcada con FITC o FITC solamente. Se llevó a cabo la visualización de los cordones nerviosos diseccionados tras la inyección en cuatro ocasiones distintas, en las que se analizaron normalmente 2-3 cordones nerviosos por tratamiento, y se obtuvieron resultados comparables. En la Fig. 32 se muestra un material compuesto que presenta diferentes regiones de los cordones nerviosos de *M. brassicae* de diferentes tratamientos. Se observó fluorescencia con poco fondo en los cordones nerviosos con FITC solamente de control y ovalbúmina marcada con FITC. En cambio, se observó fluorescencia en toda la longitud de los tractos nerviosos, incluyendo el ganglio cerebral terminal de los insectos a los que se había inyectado Hv1a/GNA o GNA marcada con FITC. La fluorescencia pareció estar localizada predominantemente en la envoltura del cordón nervioso. Se observó una menor fluorescencia en los casos en los que se había pre-incubado GNA marcada con FITC en presencia de manosa, lo que indica que la localización en el cordón nervioso estaba mediada por la unión de GNA a polipéptidos con contenido nervioso en el epitelio del cordón nervioso. Sin embargo, no se inhibió completamente la unión en las condiciones analizadas (no se muestran los resultados). Se obtuvieron resultados similares en los experimentos en los que las larvas habían sido alimentadas con dietas que contenían proteínas marcadas con FITC si bien los niveles de fluorescencia fueron menores a los observados de larvas inyectadas (Fig. 32). Esto se atribuyó a los menores niveles de GNA y Hv1a/GNA suministrados al sistema circulatorio tras la ingestión en comparación con los niveles presentes en insectos inyectados.

Explicación

Hv1a retiene la actividad insecticida cuando se fusiona con GNA

Los valores registrados anteriormente en cuanto a la toxicidad por inyección de Hv1a recombinante y sintético son muy variables incluso cuando se consideran especies diferentes del mismo género. Por ejemplo, la ED₅₀ registrada para Hv1a sintética contra el gusano del algodón *Heliothis armigera* es 3 nmoles/g (Atkinson RK, et al 1998) [7], que es más de 10 veces más la dosis PD₅₀ de 250 pmoles/g registrada para el gusano del tabaco *Heliothis virescens* (Bloomquist (2003) [8]. Manejadas por los autores de la invención, estas dosis de Hv1a y Hv1a/GNA recombinante inyectadas requirieron la inducción de parálisis flácida y una significativa mortalidad en larvas de *M. brassicae* en el quinto estadio comparable (50-100 µg toxina/g insecto equivalente a 12-25 nmoles/g), lo que indica que la actividad de Hv1a no queda comprometida significativamente por la unión en el terminal C con GNA. Sin embargo, estas dosis son en cierto modo superiores a las registradas normalmente para Hv1a recombinante (p.ej., LD₅₀ de 77 pmoles/g y 716 pmoles/g, respectivamente, para mosca, *Musca domestica*, y garrapata estrella solitaria, *Amblyomma americanum*; (Mukherjee AK et al 2006), [10]). Las diferencias de toxicidad de Hv1a contra diferentes especies debe determinarse en gran medida por las diferencias en la capacidad de la toxina para interrumpir la función del canal de iones. Sin embargo, la variabilidad deriva también del uso de diferentes parámetros de toxicidad (p.ej., LD₅₀, ED₅₀ y PD₅₀), diferentes fuentes de toxina (es decir, péptido nativo, recombinante o sintético) y la conveniencia y/o facilidad de inyección.

La fusión con GNA potencia a gran escala la toxicidad oral de Hv1a

Hv1a en solitario no fue oralmente activo cuando sirvió para alimentar larvas de *M. brassicae* en el quinto estadio. Esto es coherente con la observación de que LD₅₀ para Hv1a en la mosca de las ovejas australianas *Lucilia cuprina* es 90 veces menor cuando se suministra la toxina por vía oral en comparación con la inyección (V. Herzig y G.F.K, datos sin publicar). En llamativo contraste, la proteína de fusión Hv1a/GNA fue oralmente tóxica contra larvas de *M. brassicae* tanto en los ensayos de disco de hoja de calabaza como de goteo. Se observaron altos niveles de mortalidad y menor crecimiento para las larvas en segundo instar expuestas a discos revestidos con proteína de fusión purificada. La toxicidad oral observada en estos ensayos debe ser el resultado de la proteína de fusión Hv1a /GNA ya que GNA a una dosis comparable no redujo la supervivencia (si bien se observó un menor efecto en el crecimiento de las larvas).

Se observó que el consumo de gotas que contenían 40 µg de proteína de fusión Hv1a/GNA de larvas en quinto

estadio tenía como resultado el cese completo de la alimentación y las larvas quedaron relativamente inmóviles aparentemente, lo cual concuerda con la actividad de inducción de parálisis de la toxina descrita anteriormente (Fletcher *JI et al 1997*), (Tedford *HW 2004b*) [1,9]. Las larvas no sobrevivieron a la pupación tras el consumo de gotas de un total de 160 µg de proteína de fusión durante cuatro días. En cambio, las larvas expuestas a gotas que contenían una dosis equivalente de Hv1a no presentaron ninguna evidencia de un menor consumo de alimento o parálisis y todas sobrevivieron a la pupación. La ausencia de toxicidad aguda para Hv1a contrasta con los resultados previos, en los que se registra un 100 % de mortalidad de *Heliothis armigera* y *S. littoralis* expuestas a tabaco transgénico que expresa Hv1a (Khan *SA 2006*) [17]. Una posibilidad es que compuestos insecticidas naturales producidos por estas plantas pudieran producir perturbaciones en el epitelio del intestino del insecto y actuar en virtud de ello sinérgicamente con Hv1a para mejorar su actividad oral.

GNA media el suministro de Hv1a al SNC del insecto

La mayoría de las toxinas de araña actúan periféricamente en las uniones neuromusculares pero Hv1a actúa en sitios dentro del sistema nervioso central (Fletcher *JI et al 1997*) (Bloomquist (2003) [1,8]. Sorprendentemente, el análisis de transferencia de Western de cordones nerviosos diseccionados de insectos a los que se inyectó GNA y Hv1a/GNA indicó que GNA se une al cordón nervioso central de larvas de lepidópteros y por tanto es capaz de mediar el suministro de Hv1a a sitios de acción dentro de SNC. Asimismo, la prueba directa para la localización de GNA en el SNC fue la imagen de fluorescencia de cordones nerviosos diseccionados de larvas a las que se les había inyectado o alimentados con proteínas marcadas con FITC. El hecho de que GNA se unió a polipéptidos unidos a membrana con contenido de manosa quedó indicado por la intensa fluorescencia de la envoltura del cordón nervioso y también por la menor unión en los tejidos extraídos de insectos a los que se había inyectado GNA preincubada con manosa.

Los estudios neurofisiológicos con larvas de cucarachas, lepidópteros y dípteros han indicado que Hv1a daña la transmisión neuronal gangliónica en lugar de la conductancia a lo largo del cordón nervioso. Se cree que el retraso característico en la parálisis observada tras la inyección de la toxina se puede atribuir al tiempo necesario para que la toxina cruce la envoltura nerviosa y entre en el SNC (Fletcher *JI et al 1997*) (Bloomquist (2003) [1,8]. Los resultados presentados en este punto indican que GNA puede ayudar a localizar neurotoxinas insecticidas unidas covalentemente, como Hv1a, con el SNC de insectos expuestos y facilitar así la acción de la toxina dentro del SNC.

En conclusión, los datos presentados en el presente documento indican que GNA no solamente media el suministro de péptidos insecticidas a través del intestino del insecto, sino que también es capaz de suministrar péptidos al sistema nervioso central del insecto. En el caso de Hv1a, la mejora a gran escala de la actividad oral tras la fusión con GNA puede atribuirse a estas dos propiedades. Se han aislado muchos péptidos insecticidas de venenos de arácnidos (Tedford *HW 2004b*), (Gurevitz *M et al 2007*), (Windley *MJ et al 2012*) [9,19,20] y parece ser que la fusión con GNA proporcionaría un mecanismo general para potenciar de forma espectacular su actividad oral. Las fusiones GNA-proteína de fusión se podrían utilizar para proteger cultivos como tratamientos aplicados exógenamente o como proteínas endógenas expresadas en plantas transgénicas o entomopatógenos.

Materiales y métodos

Materiales y técnicas recombinantes

Los protocolos de biología molecular en general fueron los descritos en (Sambrook *J et al 2001*) [21], salvo que se señale de otra forma. Se llevó a cabo la subclonación utilizando un kit de clonación TOPO (vector pCR2.1 TOPO; Invitrogen). SMD1168H de cepa de *Pichia pastoris* (eficiente en proteasa A), el vector de expresión pGAPZαB y el kit de transformación de *Pichia* Easycomp fueron de Invitrogen. Sigma-Genosys Ltd sintetizó los cebadores de oligonucleótido. T4 polinucleótido quinasa fue de Fermentas. Las endonucleasas de restricción, T4 ADN ligadas y polimerasa de ADN *Pfu* fueron suministrados por Promega. El ADN de plásmido se preparó utilizando kits miniprep de Promega Wizar. Se produjo GNA como una proteína recombinante en levadura utilizando el clon generado tal como se ha descrito anteriormente (Raemaekers *RJM et al 1999*) [22]. Los anticuerpos anti-GNA (desarrollados en conejos) fueron preparados por Genosys Biotechnologies, Cambridge, RU. Los anticuerpos policlonales anti-Hv1a (desarrollados en conejos) fueron preparados por el Institute of Medical and Veterinary Science, Adelaide, Australia. Hv1a recombinante fue preparado tal como se ha descrito anteriormente (Tedford *HW et al 2004a*), (Tedford *HW et al 2001*) [2,4].

Toda la secuenciación de ADN fue llevada a cabo utilizando protocolos de terminación de cadena de didesoxinucleótido en secuenciadores de ADN automáticos de Applied Biosystems por el DNA Sequencing Service, School of Biological y Biomedical Sciences, University of Durham, RU. Se comprobaron y se ensamblaron las secuencias utilizando un software Sequencher en ordenadores Mac Os.

Ensamblaje de construcciones de expresión para la producción de proteína de fusión Hv1a /GNA

Se utilizó la secuencia de aminoácidos de Hv1a (UniProtKB P56207) como base para el ensamblaje de un gen Hv1a sintético. Se optimizó el uso de codón para la expresión en levadura

(www.levaduragenome.org/community/codonusage.shtml). Se subdividió la cadena de codificación en dos fragmentos y se subdividieron las cadenas de complementariedad en tres fragmentos, de manera que los fragmentos de codificación se solaparan con los fragmentos de la cadena de complementariedad en 21 bases. Se sintetizaron cinco oligonucleótidos basados en estos fragmentos y se utilizaron para ensamblar la secuencia de codificación de Hv1a madura (Tabla 6). Se fosforilaron en 5' todos los cebadores utilizando T4 polinucleótido quinasa. Se sometió a ebullición una solución equimolar de 100 pmoles de cada cebador fosforilado durante 10 minutos para desnaturalizar estructuras secundarias; a continuación, se enfrió la solución lentamente a temperatura ambiente (TA) para permitir que se hibridaran los cebadores. Tras la adición de T4 ADN ligasa, se dejó que se hibridaran los oligonucleótidos hibridados (en tampón ligasa) durante 15 horas a 4 °C. Para obtener suficiente ADN para la clonación en el vector de expresión de levadura pGAPZαB, se amplificó la secuencia de codificación de Hv1a por PCR utilizando cebadores que contenían sitios de restricción 5' *Pst*I y 3' *Not*I. Tras la amplificación, la purificación con gel y la digestión de restricción, se ligó el producto de PCR en una construcción de expresión de levadura generada previamente (*Trung NP et al 2006*), [14] que contenía secuencia de codificación de GNA madura (aminoácidos 1-105 derivado de ADNc LECGNA2; [23]) para crear el plásmido Hv1a/GNA-pGAPZαB.

Expresión y purificación de proteína de fusión Hv1a/GNA

Se transformó el ADN de plásmido Hv1a/GNA-pGAPZαB en células de *P. pastoris* químicamente competentes (cepa SMD1168H) de acuerdo con los protocolos suministrados por Invitrogen. Se seleccionaron transformantes colocándolos en placas sobre medio que contenía zeocina (100 µg/ml). Se seleccionó un clon que expresaba Hv1a/GNA recombinante para la producción por fermentación en laboratorio por análisis de transferencia de Western utilizando anticuerpos de sobrenadantes anti-GNA (dilución 1:3300) de cultivos a pequeña escala cultivados a 30 °C durante 2-3 días en medio YPG (1 % p/v extracto de levadura; 2 % p/v peptona; 4 % v/v glicerol; 100 µg/ml zeocina) (no se muestran los resultados).

Para la producción de proteína, se cultivaron células de *P. pastoris* que expresaban secuencias de codificación de proteína de fusión Hv1a/GNA o GNA en un fermentador de laboratorio BioFlo 110. Brevemente, se utilizaron cultivos de YPG 3 x 100 ml (cultivados durante 2-3 días a 30 °C con agitación) para inocular 3 litros de medio mínimo estéril suplementado con sales traza de PTM1 (*Higgins DR et al 1998*) (*Cino J (1999)*) [24,25]. Se llevó a cabo el cultivo a 30 °C, pH 4,5-5,0, oxígeno disuelto al 30 % (agitación en cascada 250-750 rpm) con alimentación de glicerol (5-10 ml/h; 1,3 l durante 72 h). Se separaron las proteínas secretadas de las células por centrifugación (30 minutos a 7500 g, 4 °C). Se añadió NaCl al sobrenadante a una concentración final de 2M. Se purificaron las proteínas recombinantes por cromatografía de interacción hidrófoba sobre una columna de fenil-Sefarosa (Amersham Pharmacia Biotech) (1 cm diam., 25 ml), que corrió a 2 ml/min. Después de la carga, se lavó la columna de fenil-Sefarosa con NaCl 2 M y un gradiente de sal lineal (2 M-0 M NaCl) aplicado durante 60 minutos. Hv1a/GNA recombinante eluyó a ~1 M de NaCl. A continuación, se agruparon las fracciones que contenían proteínas purificadas (analizadas por SDS-PAGE), se dializaron contra agua destilada y se liofilizaron. Se sometieron la proteína de fusión liofilizada y GNA a filtración con gel sobre columnas Sephacryl S-200 (1,6 cm diámetro, 90 cm longitud, caudal 0,3 ml/min) para eliminar las proteínas de levadura de alto peso molecular, tal como se ha descrito anteriormente (*Trung NP et al 2006*) [14]. Se volvieron a dializar fracciones con contenido de proteínas recombinantes purificadas y se liofilizaron o desalaron y concentraron utilizando concentradores de centrifuga Microsep TM (VivaScience AG, Hannover, Alemania).

Electroforesis y transferencia de Western

Se analizaron las proteínas de forma rutinaria por SDS-PAGE (17,5 % de gel de acrilamida). Se prepararon las muestras por adición de 5 x tampón de muestra de SDS (con un contenido de 10 % de β-mercaptoetanol) y ebullición durante 10 minutos antes de la carga. Se tiñeron los geles con azul de Coomassie o se transfirieron a nitrocelulosa para transferencia de Western utilizando una célula de transferencia semi seca Biorad Trans-blot SD semi de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se llevó a cabo la transferencia de Western de proteínas recombinantes y las muestras de larvas (hemolinfa y cordón nervioso) utilizando anticuerpos anti-GNA (dilución 1:3300) o anti-Hv1a (dilución 1:1000) tal como se ha descrito (*Fitches E et al 1998*) [26].

Marcado con FITC

Se marcaron fluorescentemente GNA recombinante, Hv1a/GNA y ovalbúmina (control) con un exceso molar 2:1 molar de isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma). Se re-suspendieron proteínas recombinantes (1 ml) a 2 mg/ml en 500 mM tampón carbonato, pH 9,0, después se incubaron con 50 µl de FITC (1 mg/ml en DMSO) con rotación durante 4 h a temperatura ambiente, en condiciones de oscuridad. Se dializaron las muestras contra solución salina tamponada con fosfato (PBS pH 7,4) a TA para eliminar el exceso de FITC. No se logró el marcado con FITC de Hv1a, presumiblemente por la escasez de aminas primarias disponibles para la unión de FITC.

Cría de insectos

Se obtuvieron *M. brassicae* originariamente de cultivos mantenidos en la Agencia de Investigación en Medioambiente y Alimentación (FERA) y se crearon en la universidad de Durham de forma continua con una dieta

artificial (*Bown DP et al 1997*) [27] a 22-25 °C en un régimen de luz : oscuridad, 16 h:8 h.

Bioensayos de inyección

5 Se analizaron péptido Hv1a recombinante purificado y Hv1a/GNA en cuanto a su actividad biológica inyectando 4-5 µl de muestras acuosas (proteína liofilizada re-suspendida en PBS) en larvas de *M. brassicae* en quinto estadio recién eclosionadas (40-70 mg). Para cada concentración analizada, se inyectaron 10-20 larvas y se llevó un seguimiento de los efectos tóxicos durante 4 días. Se inyectó PBS como control negativo. Se sabe que GNA recombinante no tiene efecto sobre las larvas de *M. brassicae* cuando se inyectan hasta 200 µg/larva (datos sin publicar).

Bioensayos de alimentación

Ensayos de alimentación con gotas: *M. brassicae*

15 Se llevaron a cabo varios ensayos de alimentación con gotas para valorar la actividad oral de Hv1a/GNA contra larvas de *M. brassicae* en cuarto y quinto estadio. El número de muestras final fue relativamente reducido ($n = 7-8$ por tratamiento) ya que las larvas fueron reticentes a ingerir diariamente las gotas y se descartaron los insectos que no consumieron un goteo completo de 5 µl de los grupos de datos. En el presente documento, se describen dos ensayos representativos.

25 **Ensayo de goteo 1:** se alimentó a larvas de quinto estadio recién mudadas diariamente durante 4 días con gotas de 5 µl que contenían 40 µg de Hv1a/GNA o 9,6 µg de toxina Hv1a en 1 x PBS y 10 % de solución de sacarosa. Se alimentó a las larvas de control con gotas que contenían 40 µg de albúmina de suero bovino (BSA). Para estimular el consumo de las gotas, se privó de alimento a las larvas durante ~2-3 h antes de la alimentación. Se registró el peso de las larvas diariamente ~1 h después de la alimentación con gotas. Se colocaron las larvas tratadas individualmente en tientos de plástico ventilados (250 ml) con dieta artificial normal. Al cabo de 4 días de la alimentación con gotas diariamente, se mantuvo a las larvas con una dieta óptima hasta el inicio de la pupación.

30 **Ensayo de goteo 2:** se alimentó a larvas en el cuarto estadio recién mudadas con gotas de 5 µl que contenían 40 µg de omega/GNA o 40 µg de BSA (control) en 1 x PBS y 10 % de sacarosa. Se mantuvo a las larvas tal como se ha descrito y se registraron los pesos diariamente durante 10 días.

Ensayos de disco de hoja: *M. brassicae*

35 Se analizó además la actividad oral de Hv1a/GNA alimentando larvas *M. brassicae* en segundo instar con discos de hojas de calabaza (*Brassicae oleracea*) revestidos con proteína de fusión purificada a concentraciones de 0,2 % p/p y 0,1 % p/p (es decir, 10 mg/5 g y 5 mg/5 g de hoja de peso en húmedo, respectivamente) o GNA recombinante a 0,2 % p/p. Se prepararon discos (-20 mm diámetro, 140 mg peso fresco) añadiendo gotas de proteína (re-suspendida en 0,5 x PBS y 0,1 % v/v Tween) en las superficies inferior y superior de los discos y se secó al aire. Se prepararon discos de control con 0,5 x PBS, 0,1 % v/v Tween. Se criaron las larvas desde la eclosión durante 72 horas con calabaza no tratada y después se colocaron en tientos de plástico ventilados (250 ml) que contenían discos de hoja revestidos y papel de filtro de humedad para evitar la desecación. Se proporcionaron los discos recién preparados cada 2 -3 días. Se ensayaron dos replicados de 10 larvas por tratamiento. Se registró la supervivencia durante 10 días. Para reducir el tiempo de manejo, se registró el peso de las larvas los días 4, 7 y 10.

Extracción de hemolinfa y disección de cordón nervioso

50 Se extrajeron muestras de hemolinfa y se prepararon para análisis de Western [12] desde el día 2 de larvas en el quinto instar alimentadas durante 24 horas con dieta que contenía Hv1a/GNA a 2 mg/5 g de peso en húmedo (~2 % proteína de la dieta). Normalmente, se hicieron correr partes alícuotas de muestras de dos replicados que contenían hemolinfa agrupada (3-5 larvas por muestra) en geles SDS-PAGE y se analizaron por inmunotransferencia utilizando anticuerpos anti-GNA. Para investigar si GNA o Hv1a/GNA estaban localizados en el SNC tras el suministro oral o inyección, se analizaron los cordones nerviosos a través de uno de los dos métodos. Se diseccionaron cordones nerviosos de larvas en el sexto estadio 4-24 horas después de la inyección o después de alimentarlas con gotas que contenían 20-50 µg de GNA o proteína de fusión. A continuación, se analizó el tejido nervioso por transferencia de Western o visualmente con un microscopio fluorescente (sección 2.11). Se diseccionaron los cordones nerviosos del siguiente modo. Se sumergieron larvas enfriadas previamente en agua destilada enfriada con hielo antes de realizar una incisión ventral desde la cola hasta la cápsula cefálica. Se fijaron las pestañas resultantes de la cutícula con pasadores en cera de disección. Se separó cuidadosamente todo el intestino y después se dividió la cápsula cefálica para exponer los ganglios del cerebro terminales. A continuación, se separó el cordón nervioso intacto y el cerebro (utilizando unas pinzas) de la cutícula y la cápsula cefálica y se sumergieron inmediatamente en tampón de muestra SDS para análisis de transferencia de Western o en 3,7 % p/v de paraformaldehído (PFA) para microscopio.

Microscopio fluorescente

Se extrajeron cordones nerviosos de larvas en el sexto estadio 4 horas después de la inyección de -10 µg de GNA marcado con FITC o Hv1a/GNA marcado con FITC. Se inyectó a las larvas también GNA que había sido preincubado durante 1 hora a TA con 0,2 M de manosa (metil α-D-manopiranosida). Se extrajeron también los cordones nerviosos de las larvas después de alimentarlas con dieta artificial que contenía GNA marcado con FITC o Hv1a/GNA marcado con FITC, de manera que cada larva consumiera 50-100 µg de proteína marcada. Los tratamientos de control incluyeron ovalbúmina marcada con FITC (10 µg por inyección, 50-100 µg por ingestión) y FITC en solitario (0,5 µg por inyección, 2,5 µg por ingestión). Tras la disección y la inmersión en PFA (30-60 min), se lavaron los cordones nerviosos 3 x en PBS enfriado con hielo (15 min por lavado), se montaron en portaobjetos de vidrio y se superpusieron con cubreobjetos. Se visualizaron los cordones nerviosos utilizando un microscopio fluorescente (Nikon) con un filtro de FITC (absorbancia 494 nm; emisión 521 nm) y se capturaron imágenes en OpenLab.

15 Análisis estadístico

Se analizaron los datos utilizando Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.). Se compararon las curvas de supervivencia de insecto de Kaplan-Meier utilizando pruebas de rango logarítmico Mantel-Cox. Se compararon los pesos de los insectos utilizando o bien pruebas T de Student o bien análisis de varianza en una vía (ANOVA), seguido de separación por *post hoc* de Tukey-Kramer *post hoc*. El nivel de significancia aceptado fue $P < 0,05$ en todos los casos.

Tabla 6. Secuencias de oligonucleótido utilizadas para ensamblar y ampliar un gen sintético de codificación de toxina Hv1a madura

25 Cadena de codificación

Oligo 1:
5'-GCATCTCCAACCTTGTATTCCATCTGGTCAACCATGTCCATATAATGAAAATTGTTGT (SEQ ID No: 22)

30 Oligo 2:
5'-TCTCAATCTTGTACTTTTAAAGAAAATGAAAATGGTAATACTGTTAAAAGATGTGATGC (SEQ ID No: 23)

Oligo 3:
ACGTCTAGAGGTTGAACATAAGGTAGACCAGTTGGTACA (SEQ ID No: 24)

35 Oligo 4:
GGTATATTACTTTTAAACAACAAGAGTTAGAACATGAAAATTT (SEQ ID No: 25)

Oligo 5:
CTTTTACTTTTACCATTATGACAATTTTCTACACTACGCCCGG (SEQ ID No: 26)

Cebadores para amplificación de secuencia de longitud completa

40 Cebador directo:
5' TAACTGCAGCATCTCCAACCTTGTATTCC (SEQ ID No: 27)

Cebador inverso:
5' TTAGCGCCGCATCACATCTTTTAAACAG (SEQ ID No: 28)

45 Las bases subrayadas representan sitios de restricción (*Pst*I y *Not* I) utilizados para la ligación del fragmento de longitud completa en el vector de expresión de levadura pGAPZαB.

Tabla 7: Mortalidad registrada para larvas *M. brassicae* en quinto estadio 72 h tras la inyección de diferentes concentraciones de Hv1a y Hv1a / GNA recombinante

50 Tratamiento	Dosis (µg/insecto) (equivalentes Hv1a)	Mortalidad (%)	Muestra No
Control	-	0	20
Hv1a	184	90*	10
	92	80*	10
	46	20	10
	100	90*	20
Hv1a/GNA	50	45*	20
	25	0	20

Las dosis inyectadas de Hv1a/GNA se expresan como equivalentes de Hv1a para permitir una comparación directa con el tratamiento de Hv1a y se basan en una media del peso de la larva con una inyección de 50 mg. Los asteriscos representan una diferencia significativa en la supervivencia entre el tratamiento de control y con toxina ($P < 0,0001$).

Referencias

- 5 1. Fletcher JI, Smith R, O'Donoghue SI, Nilges M, Connor M, et al. (1997) The structure of a novel insecticidal neurotoxin, β -atracotoxin-Hv1, from the venom of an Australian funnel web spider. *Nat Struct. Biol* 4: 559-566.
2. Tedford HW, Gilles N, Menez A, Doering CJ, Zamponi GW, et al. (2004a) Scanning mutagenesis of β -atracotoxin-Hv1a reveals a spatially restricted epitope that confers selective activity against invertebrate calcium channels. *J Biol Chem* 279: 44133-44140.
- 10 4. Tedford HW, Fletcher JI, King GF (2001) Functional significance of the β -hairpin in the insecticidal neurotoxin atracotoxin-Hv1a. *J Biol Chem* 276: 26568-26576.
7. Atkinson RK, Howden MEH, Tyler MI, Vonarx EJ (June 1998) Insecticidal toxins derived from funnel web (*Atrax* or *Hadronyche*) spiders U S Patent No. 5763568
- 15 8. Bloomquist (2003) Mode of action of atracotoxin at central and peripheral synapses of insects. *Invert Neurosci* 5: 45-50.
9. Tedford HW, Sollod BL, Maggio F, King GF (2004b) Australian funnel-web spiders: master insecticide chemists. *Toxicon* 43: 601-618.
- 20 10. Mukherjee AK, Sollod BL, Wikel SK, King GF (2006) Orally active acaricidal peptide toxins from spider venom. *Toxicon* 47: 182-187.
- 25 14. Trung NP, Fitches E, Gatehouse JA (2006) A fusion protein containing a lepidopteran-specific toxin from the South Indian red scorpion (*Mesobuthus tamulus*) and snowdrop lectin shows oral toxicity to target insects. *BMC Biotech* 6:18.
- 30 17. Khan SA, Zafar Y, Briddon RW, Malik KA, Mukhtar Z (2006) Spider venom toxin protects plants from insect attack. *Transgenic Res* 15: 349-357.
19. Gurevitz M, Karbat I, Cohen L, Ilan N, Kahn R et al. (2007) *Toxicon* 49:473-489.
- 35 20. Windley MJ, Herzig V, Dziemborowicz SA, Hardy MC, King GF et al. (2012) Spider-venom peptides as bioinsecticides. *Toxins*: In press.
21. Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd edn, Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- 40 22. Raemaekers RJM, deMuro L, Gatehouse JA, FordhamSkelton AP (1999) Functional phytohemagglutinin (PHA) and *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) expressed in *Pichia pastoris* - Correct N terminal processing and secretion of heterologous proteins expressed using the PHA-E signal peptide. *Eur J Biochem* 265:394-403.
- 45 26. Fitches E, Gatehouse JA (1998) A comparison of the short and long term effects of insecticidal lectins on the activities of soluble and brush border enzymes of tomato moth larvae (*Lacanobia oleracea*). *J Insect Phys* 44:1213-1224.
- 50 27. Bown DP, Wilkinson HS, Gatehouse JA, (1997) Differentially regulated inhibitor sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest *Helicoverpa armigera*, are members of complex multi-gene families. *Insect Biochem Mol Biol* 27: 625-638. the insecticidal neurotoxin β -atracotoxin-Hv1a. *J Biol Chem* 276: 26568-26576.
- 55 7. Atkinson RK, Howden MEH, Tyler MI, Vonarx EJ (June 1998) Insecticidal toxins derived from funnel web (*Atrax* or *Hadronyche*) spiders U S Patent No. 5763568
8. Bloomquist (2003) Mode of action of atracotoxin at central and peripheral synapses of insects. *Invert Neurosci* 5: 45-50.
- 60 9. Tedford HW, Sollod BL, Maggio F, King GF (2004b) Australian funnel-web spiders: master insecticide chemists. *Toxicon* 43: 601-618.
10. Mukherjee AK, Sollod BL, Wikel SK, King GF (2006) Orally active acaricidal peptide toxins from spider venom. *Toxicon* 47: 182-187.
- 65 14. Trung NP, Fitches E, Gatehouse JA (2006) A fusion protein containing a lepidopteran-specific toxin from the

South Indian red scorpion (*Mesobuthus tamulus*) and snowdrop lectin shows oral toxicity to target insects. *BMC Biotech* 6:18.

- 5 17. Khan SA, Zafar Y, Briddon RW, Malik KA, Mukhtar Z (2006) Spider venom toxin protects plants from insect attack. *Transgenic Res* 15: 349-357.
19. Gurevitz M, Karbat I, Cohen L, Ilan N, Kahn R et al. (2007) *Toxicon* 49:473-489.
- 10 20. Windley MJ, Herzig V, Dziemborowicz SA, Hardy MC, King GF et al. (2012) Spider-venom peptides as bioinsecticides. *Toxins*: In press.
21. Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd edn, Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- 15 22. Raemaekers RJM, deMuro L, Gatehouse JA, FordhamSkelton AP (1999) Functional phytohemagglutinin (PHA) and *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) expressed in *Pichia pastoris* - Correct N terminal processing and secretion of heterologous proteins expressed using the PHA-E signal peptide. *Eur J Biochem* 265:394-403.
- 20 26. Fitches E, Gatehouse JA (1998) A comparison of the short and long term effects of insecticidal lectins on the activities of soluble and brush border enzymes of tomato moth larvae (*Lacanobia oleracea*). *J Insect Phys* 44:1213-1224.
- 25 27. Bown DP, Wilkinson HS, Gatehouse JA, (1997) Differentially regulated inhibitor sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest *Helicoverpa armigera*, are members of complex multi-gene families. *Insect Biochem Mol Biol* 27: 625-638.

LISTADO DE SECUENCIAS

30 <110> University of Durham
The Food and Environment Research Agency (FERA),
representing the Secretary of State for Environment, Food and
Rural Affairs

<120> Plaguicida de toxina de araña

35 <130> PL401462WO

<150> GB1105418.6
<151> 31-03-2011

40 <160> 28

<170> PatentIn versión 3.3

45 <210> 1
<211> 37
<212> PRT
<213> *Hadronyche versuta*

50 <400> 1

Ser Pro Thr Cys Ile Pro Ser Gly Gln Pro Cys Pro Tyr Asn Glu Asn
1 5 10 15

Cys Cys Ser Gln Ser Cys Thr Phe Lys Glu Asn Glu Asn Gly Asn Thr
20 25 30

Val Lys Arg Cys Asp
35

55 <210> 2
<211> 37
<212> PRT

ES 2 674 324 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia de toxina natural modificada

5 <400> 2

Ser Pro Thr Cys Ile Pro Ser Gly Gln Pro Cys Pro Tyr Asn Glu Asn
 1 5 10 15
 Cys Cys Ser Gln Ser Cys Thr Phe Lys Glu Asn Glu Asn Gly Asn Thr
 20 25 30
 Val Gln Arg Cys Asp
 35

10 <210> 3
 <211> 105
 <212> PRT
 213> *Galanthus nivalis*

15 <400> 3

Asp Asn Ile Leu Tyr Ser Gly Glu Thr Leu Ser Thr Gly Glu Phe Leu
 1 5 10 15
 Asn Tyr Gly Ser Phe Val Phe Ile Met Gln Glu Asp Cys Asn Leu Val
 20 25 30
 Leu Tyr Asp Val Asp Lys Pro Ile Trp Ala Thr Asn Thr Gly Gly Leu
 35 40 45
 Ser Arg Ser Cys Phe Leu Ser Met Gln Thr Asp Gly Asn Leu Val Val
 50 55 60
 Tyr Asn Pro Ser Asn Lys Pro Ile Trp Ala Ser Asn Thr Gly Gly Gln
 65 70 75 80
 Asn Gly Asn Tyr Val Cys Ile Leu Gln Lys Asp Arg Asn Val Val Ile
 85 90 95
 Tyr Gly Thr Asp Arg Trp Ala Thr Gly
 100 105

20 <210> 4
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión

25 <400> 4

ES 2 674 324 T3

Asp Asn Ile Leu Tyr Ser Gly Glu Thr Leu Ser Thr Gly Glu Phe Leu
 1 5 10 15

Asn Tyr Gly Ser Phe Val Phe Ile Met Gln Glu Asp Cys Asn Leu Val
 20 25 30

Leu Tyr Asp Val Asp Lys Pro Ile Trp Ala Thr Asn Thr Gly Gly Leu
 35 40 45

Ser Arg Ser Cys Phe Leu Ser Met Gln Thr Asp Gly Asn Leu Val Val
 50 55 60

Tyr Asn Pro Ser Asn Lys Pro Ile Trp Ala Ser Asn Thr Gly Gly Gln
 65 70 75 80

Asn Gly Asn Tyr Val Cys Ile Leu Gln Lys Asp Arg Asn Val Val Ile
 85 90 95

Tyr Gly Thr Asp Arg Trp Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ser Pro Thr Cys
 100 105 110

Ile Pro Ser Gly Gln Pro Cys Pro Tyr Asn Glu Asn Cys Cys Ser Gln
 115 120 125

Ser Cys Thr Phe Lys Glu Asn Glu Asn Gly Asn Thr Val Lys Arg Cys
 130 135 140

Asp Val Asp His His His His His His
 145 150

- 5 <210> 5
- <211> 151
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 10 <223> Proteína de fusión
- <400> 5

ES 2 674 324 T3

His His His His His His Asp Asn Ile Leu Tyr Ser Gly Glu Thr Leu
 1 5 10 15
 Ser Thr Gly Glu Phe Leu Asn Tyr Gly Ser Phe Val Phe Ile Met Gln
 20 25 30
 Glu Asp Cys Asn Leu Val Leu Tyr Asp Val Asp Lys Pro Ile Trp Ala
 35 40 45
 Thr Asn Thr Gly Gly Leu Ser Arg Ser Cys Phe Leu Ser Met Gln Thr
 50 55 60
 Asp Gly Asn Leu Val Val Tyr Asn Pro Ser Asn Lys Pro Ile Trp Ala
 65 70 75 80
 Ser Asn Thr Gly Gly Gln Asn Gly Asn Tyr Val Cys Ile Leu Gln Lys
 85 90 95
 Asp Arg Asn Val Val Ile Tyr Gly Thr Asp Arg Trp Ala Thr Gly Ala
 100 105 110
 Ala Ala Ser Pro Thr Cys Ile Pro Ser Gly Gln Pro Cys Pro Tyr Asn
 115 120 125
 Glu Asn Cys Cys Ser Gln Ser Cys Thr Phe Lys Glu Asn Glu Asn Gly
 130 135 140
 Asn Thr Val Gln Arg Cys Asp
 145 150

<210> 6
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión

10

<400> 6

ES 2 674 324 T3

Ala Ser Pro Thr Cys Ile Pro Ser Gly Gln Pro Cys Pro Tyr Asn Glu
 1 5 10 15

Asn Cys Cys Ser Gln Ser Cys Thr Phe Lys Glu Asn Glu Asn Gly Asn
 20 25 30

Thr Val Lys Arg Cys Asp Ala Ala Ala Asp Asn Ile Leu Tyr Ser Gly
 35 40 45

Glu Thr Leu Ser Thr Gly Glu Phe Leu Asn Tyr Gly Ser Phe Val Phe
 50 55 60

Ile Met Gln Glu Asp Cys Asn Leu Val Leu Tyr Asp Val Asp Lys Pro
 65 70 75 80

Ile Trp Ala Thr Asn Thr Gly Gly Leu Ser Arg Ser Cys Phe Leu Ser
 85 90 95

Met Gln Thr Asp Gly Asn Leu Val Val Tyr Asn Pro Ser Asn Lys Pro
 100 105 110

Ile Trp Ala Ser Asn Thr Gly Gly Gln Asn Gly Asn Tyr Val Cys Ile
 115 120 125

Leu Gln Lys Asp Arg Asn Val Val Ile Tyr Gly Thr Asp Arg Trp Ala
 130 135 140

Thr Gly
 145

- <210> 7
- <211> 154
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Proteína de fusión
- <400> 7

ES 2 674 324 T3

Ala Ser Pro Thr Cys Ile Pro Ser Gly Gln Pro Cys Pro Tyr Asn Glu
 1 5 10 15

Asn Cys Cys Ser Gln Ser Cys Thr Phe Lys Glu Asn Glu Asn Gly Asn
 20 25 30

Thr Val Lys Arg Cys Asp Ala Ala Ala Asp Asn Ile Leu Tyr Ser Gly
 35 40 45

Glu Thr Leu Ser Thr Gly Glu Phe Leu Asn Tyr Gly Ser Phe Val Phe
 50 55 60

Ile Met Gln Glu Asp Cys Asn Leu Val Leu Tyr Asp Val Asp Lys Pro
 65 70 75 80

Ile Trp Ala Thr Asn Thr Gly Gly Leu Ser Arg Ser Cys Phe Leu Ser
 85 90 95

Met Gln Thr Asp Gly Asn Leu Val Val Tyr Asn Pro Ser Asn Lys Pro
 100 105 110

Ile Trp Ala Ser Asn Thr Gly Gly Gln Asn Gly Asn Tyr Val Cys Ile
 115 120 125

Leu Gln Lys Asp Arg Asn Val Val Ile Tyr Gly Thr Asp Arg Trp Ala
 130 135 140

Thr Gly Val Asp His His His His His
 145 150

5 <210> 8
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Proteína de fusión

<400> 8

ES 2 674 324 T3

Ala Ser Pro Thr Cys Ile Pro Ser Gly Gln Pro Cys Pro Tyr Asn Glu
 1 5 10 15

Asn Cys Cys Ser Gln Ser Cys Thr Phe Lys Glu Asn Glu Asn Gly Asn
 20 25 30

Thr Val Gln Arg Cys Asp Ala Ala Ala Asp Asn Ile Leu Tyr Ser Gly
 35 40 45

Glu Thr Leu Ser Thr Gly Glu Phe Leu Asn Tyr Gly Ser Phe Val Phe
 50 55 60

Ile Met Gln Glu Asp Cys Asn Leu Val Leu Tyr Asp Val Asp Lys Pro
 65 70 75 80

Ile Trp Ala Thr Asn Thr Gly Gly Leu Ser Arg Ser Cys Phe Leu Ser
 85 90 95

Met Gln Thr Asp Gly Asn Leu Val Val Tyr Asn Pro Ser Asn Lys Pro
 100 105 110

Ile Trp Ala Ser Asn Thr Gly Gly Gln Asn Gly Asn Tyr Val Cys Ile
 115 120 125

Leu Gln Lys Asp Arg Asn Val Val Ile Tyr Gly Thr Asp Arg Trp Ala
 130 135 140

Thr Gly
 145

5 <210> 9
 <211> 152
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Proteína de fusión

<400> 9

ES 2 674 324 T3

Ala Ser Pro Thr Cys Ile Pro Ser Gly Gln Pro Cys Pro Tyr Asn Glu
 1 5 10 15
 Asn Cys Cys Ser Gln Ser Cys Thr Phe Lys Glu Asn Glu Asn Gly Asn
 20 25 30
 Thr Val Gln Arg Cys Asp Ala Ala Ala Asp Asn Ile Leu Tyr Ser Gly
 35 40 45
 Glu Thr Leu Ser Thr Gly Glu Phe Leu Asn Tyr Gly Ser Phe Val Phe
 50 55 60
 Ile Met Gln Glu Asp Cys Asn Leu Val Leu Tyr Asp Val Asp Lys Pro
 65 70 75 80
 Ile Trp Ala Thr Asn Thr Gly Gly Leu Ser Arg Ser Cys Phe Leu Ser
 85 90 95
 Met Gln Thr Asp Gly Asn Leu Val Val Tyr Asn Pro Ser Asn Lys Pro
 100 105 110
 Ile Trp Ala Ser Asn Thr Gly Gly Gln Asn Gly Asn Tyr Val Cys Ile
 115 120 125
 Leu Gln Lys Asp Arg Asn Val Val Ile Tyr Gly Thr Asp Arg Trp Ala
 130 135 140
 Thr Gly His His His His His His
 145 150

5 <210> 10
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Proteína de fusión
 <400> 10

Met Arg Phe Pro Ser Phe Leu Leu Leu Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1 5 10 15

ES 2 674 324 T3

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
 20 25 30
 Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
 35 40 45
 Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
 50 55 60
 Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Ala Ala Ser Pro Thr Cys Ile
 85 90 95
 Pro Ser Gly Gln Pro Cys Pro Tyr Asn Glu Asn Cys Cys Ser Gln Ser
 100 105 110
 Cys Thr Phe Lys Glu Asn Glu Asn Gly Asn Thr Val Gln Arg Cys Asp
 115 120 125
 Ala Ala Ala Asp Asn Ile Leu Tyr Ser Gly Glu Thr Leu Ser Thr Gly
 130 135 140
 Glu Phe Leu Asn Tyr Gly Ser Phe Val Phe Ile Met Gln Glu Asp Cys
 145 150 155 160
 Asn Leu Val Leu Tyr Asp Val Asp Lys Pro Ile Trp Ala Thr Asn Thr
 165 170 175
 Gly Gly Leu Ser Arg Ser Cys Phe Leu Ser Met Gln Thr Asp Gly Asn
 180 185 190
 Leu Val Val Tyr Asn Pro Ser Asn Lys Pro Ile Trp Ala Ser Asn Thr
 195 200 205
 Gly Gly Gln Asn Gly Asn Tyr Val Cys Ile Leu Gln Lys Asp Arg Asn
 210 215 220
 Val Val Ile Tyr Gly Thr Asp Arg Trp Ala Thr Gly Val Asp His His
 225 230 235 240
 His His His His Ser Arg
 245

<210> 11
 <211> 111
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> ácido nucleico que codifica toxina modificada

10

ES 2 674 324 T3

<400> 11

tctccaactt gtattccatc tggccaacca tgtccatata atgaaaattg ttgttctcaa 60
 tcttgtactt ttaaagaaaa tgaaaatggt aatactgttc aaagatgtga t 111

5 <210> 12
 <211> 314
 <212> ADN
 <213> *Galanthus nivalis*

10 <400> 12

gacaatattt tgtactccgg tgagactctc tctacagggg aatttctcaa ctacggaagt 60
 ttcgttttta tcatgcaaga ggactgcaat ctggctttgt acgacgtgga caagccaatc 120
 tgggcaacaa acacaggtgg tctctcccgt agctgcttcc tcagcatgca gactgatggg 180
 aacctcgtgg tgtacaaccc atcgaacaaa ccgatttggg caagcaacac tggaggccaa 240
 aatgggaatt acgtgtgcat cctacagaag gataggaatg ttgtgatcta cggaactgat 300
 cgttgggcca ctgg 314

15 <210> 13
 <211> 735
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> ácido nucleico para péptido señal fusionado con proteína de fusión

<400> 13

atgagatttc cttcattttt actgctgggt ttattcgcag catctccgc attagctgct 60
 ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggg 120
 tactcagatt tagaagggga tttcgatggt gctgttttgc cattttccaa cagcacaat 180
 aacgggttat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta 240
 tctctcgaga aaagagaggc tgaagctgca gcctctccaa cttgtattcc atctggtaaa 300
 ccatgtccat ataatgaaaa ttgttgttct caatcttcta cttttaaaga aaatgaaaat 360
 ggtaaactg ttcaagatg tgatgcggcc gccgacaata ttttgtactc cggtgagact 420
 ctctctacag ggaatttct caactacgga agtttcgttt ttatcatgca agaggactgc 480
 aatctggtct tgtacgacgt ggacaagcca atctgggcaa caaacacagg tggctctctcc 540
 cgtagctgct tcctcagcat gcagactgat gggaacctcg tgggtgtacaa cccatcgaac 600
 aaaccgattt gggcaagcaa cactggaggc caaatggga attacgtgtg catctacag 660
 aaggatagga atgttgtgat ctacggaact gatcgttggg ccactggagt ggaccatcat 720
 catcatcatc attga 735

25 <210> 14
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> *Mesobuthus tamulus*

ES 2 674 324 T3

<400> 14

Arg Cys Gly Pro Cys Phe Thr Thr Asp Pro Gln Thr Gln Ala Lys Cys
1 5 10 15

Ser Glu Cys Cys Gly Arg Lys Gly Gly Val Cys Lys Gly Pro Gln Cys
20 25 30

Ile Cys Gly Ile Gln
35

5 <210> 15
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> péptido señal GNA

<400> 15

Met Ala Lys Ala Ser Leu Leu Ile Leu Ala Ala Ile Phe Leu Gly Val
1 5 10 15

Ile Thr Pro Ser Cys Leu Ser
20

15 <210> 16
<211> 171
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Proteína de fusión

25 <400> 16

ES 2 674 324 T3

Met Ala Lys Ala Ser Leu Leu Ile Leu Ala Ala Ile Phe Leu Gly Val
 1 5 10 15
 Ile Thr Pro Ser Cys Leu Ser Ala Ala Ala Arg Cys Gly Pro Cys Phe
 20 25 30
 Thr Thr Asp Pro Gln Thr Gln Ala Lys Cys Ser Glu Cys Cys Gly Arg
 35 40 45
 Lys Gly Gly Val Cys Lys Gly Pro Gln Cys Ile Cys Gly Ile Gln Ala
 50 55 60
 Ala Ala Asp Asn Ile Leu Tyr Ser Gly Glu Thr Leu Ser Thr Gly Glu
 65 70 75 80
 Phe Leu Asn Tyr Gly Ser Phe Val Phe Ile Met Gln Glu Asp Cys Asn
 85 90 95
 Leu Val Leu Tyr Asp Val Asp Lys Pro Ile Trp Ala Thr Asn Thr Gly
 100 105 110
 Gly Leu Ser Arg Ser Cys Phe Leu Ser Met Gln Thr Asp Gly Asn Leu
 115 120 125
 Val Val Tyr Asn Pro Ser Asn Lys Pro Ile Trp Ala Ser Asn Thr Gly
 130 135 140
 Gly Gln Asn Gly Asn Tyr Val Cys Ile Leu Gln Lys Asp Arg Asn Val
 145 150 155 160
 Val Ile Tyr Gly Thr Asp Arg Trp Ala Thr Gly
 165 170

<210> 17
 <211> 516
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> ácido nucleico para proteína de fusión

10

<400> 17

ES 2 674 324 T3

atggctaagg caagtctcct cattttggcc gccatcttcc ttggtgtcat cacaccatct 60
 tgcctgagtg ctgcagcaag gtgtggctct tgccttataa ctgatcctca aacacaagcc 120
 aagtgtagtg agtgttgtgg gcgaaagggg ggagtatgca agggcccaca atgtatctgt 180
 ggtatacaag cggccgccga caatattttg tactccgggtg agactctctc tacaggggaa 240
 tttctcaact acggaagttt cgtttttatc atgcaagagg actgcaatct ggtcttgtac 300
 gacgtggaca agccaatctg ggcaacaaac acaggtgggc tctcccgtag ctgcttctc 360
 agcatgcaga ctgatgggaa cctcgtgggtg tacaacccat cgaacaaacc gatttgggca 420
 agcaacactg gaggccaaaa tgggaattac gtgtgcatcc tacagaagga taggaatggt 480
 gtgatctacg gaactgatcg ttgggctact ggatga 516

5 <210> 18
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> secuencia de oligonucleótidos
 <400> 18
 tggctctcc cgtagctgct t 21

15 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> secuencia de oligonucleótidos
 <400> 19
 atcgaacaaa cggatttggg 20

25 <210> 20
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> secuencia de oligonucleótidos
 <400> 20
 cggatgtgt aaggccggat a 21

35 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> secuencia de oligonucleótidos
 <400> 21
 acgaccgatg ggaacactgt 20

45 <210> 22
 <211> 57
 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia de oligonucleótidos
 5
 <400> 22
 gcatctccaa cttgtattcc atctggtaaa ccatgtccat ataataaaaa ttgttgt 57
 <210> 23
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> secuencia de oligonucleótidos
 15
 <400> 23
 tctcaatct gtacttttaa agaaaaatgaa aatggtaata ctgttaaaag atgtgatgc 59
 <210> 24
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> secuencia de oligonucleótidos
 25
 <400> 24
 acgtgtaga ggtgaacat aaggtagacc agttgtaca 40
 30
 <210> 25
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> secuencia de oligonucleótidos
 40
 <400> 25
 ggtatattac ttttaacaac aagagttaga acatgaaaat tt 42
 <210> 26
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> secuencia de oligonucleótidos
 50
 <400> 26
 cttttacttt taccattatg acaattttct acactacgcc gg 42
 <210> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> secuencia de oligonucleótidos
 60
 <400> 27
 taactgcagc atctccaact tgtattcc 28
 <210> 28
 <211> 28

<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> secuencia de oligonucleótidos

<400> 28
ttagcggccg catcacatct ttaacag 28

10

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende: (i) una toxina proteica ω -ACTX-Hv1a que comprende la secuencia de aminoácidos SPTCIPSGQPCYPYENCCSQSCTFKENENGNTVKRCD (SEQ ID NO: 1), o una variante de la misma que retiene sustancialmente la actividad biológica de la toxina proteica ω -ACTX-Hv1a, teniendo dicha variante una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 % de identidad con la SEQ ID NO: 1; unida operativamente a (ii) una proteína capaz de mediar la translocación de la proteína de fusión desde el intestino del invertebrado, en donde la proteína capaz de mediar la translocación de la proteína de fusión desde el intestino del invertebrado es una lectina vegetal seleccionada entre una cualquiera o más de las siguientes: lectina de galanto (GNA), lectina de ajo *Allium sativum*, lectina de guisante *Pisum sativum* (P-lect), lectina de cacahuete *Arachis hypogaea*, lectina de judía verde (PHA, *Phytohaemagglutinin*).
2. La proteína de fusión de la reivindicación 1 en donde la toxina proteica ω -ACTX-Hv1a está operativamente unida al extremo N de la proteína capaz de mediar la translocación de la proteína de fusión desde el intestino de invertebrado.
3. La proteína de fusión de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 que comprende la secuencia de aminoácidos
ASPTCIPSGQPCYPYENCCSQSCTFKENENGNTVQRCDAAADNILYSGETLSTGEFLNYGS
FVFIMQEDCNLVLYDVKPIWATNTGGLSRSCFLSMQTDGNLVVYNPSNKPIWASNTGGQ
NGNYVCILQKDRNVVIYGTDRWATGHHHHHH (SEQ ID NO:9).
4. La proteína de fusión de la reivindicación 1 en donde la toxina proteica ω -ACTX-Hv1a está operativamente unida al extremo C de la proteína capaz de mediar la translocación de la proteína de fusión desde el intestino del invertebrado.
5. La proteína de fusión de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 4 que comprende la secuencia de aminoácidos
HHHHHHDNILYSGETLSTGEFLNYGSFVFIMQEDCNLVLYDVKPIWATNTGGLSRSCFLS
MQTDGNLVVYNPSNKPIWASNTGGQNGNYVCILQKDRNVVIYGTDRWATGAAASPTCIPS
GQPCYPYENCCSQSCTFKENENGNTVQRCD (SEQ ID NO:5).
6. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el aminoácido K34 de toxina proteica ω -ACTX-Hv1a está modificado, tal como mediante una sustitución de K34Q.
7. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína capaz de mediar la translocación de la proteína de fusión desde el intestino de invertebrado es lectina de galanto (GNA).
8. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína comprende además una etiqueta de afinidad para favorecer la purificación, como pueda ser una etiqueta His.
9. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína tiene actividad plaguicida contra plagas de invertebrados, incluyendo insectos, moluscos, artrópodos, nematodos y moluscos, incluyendo Coleópteros p.ej., doradilla (*Diabrotica undecimpunctata*); gorgojo de la judía (*Callosobruchus maculatus*); Lepidópteros, p.ej., barrenador del maíz europeo (*Ostinia nubilalis*); polilla del cuerno del tabaco (*Manduca sexta*); barrenador del tallo (*Chilo partellus*); plagas de Homópteros p.ej. saltamontes pardo del arroz (*Nilaparvata lugens*); saltamontes de las hojas verdes del arroz (*Nephotettix cinciteps*); saltamontes de la patata (*Empoasca fabae*); pulgón verde del melocotonero (*Myzus persicae*); pulgón del guisante (*Acyrtosiphon pisum*); Dípteros, p.ej., mosca amarilla de las cañas (*Chlorop pumilionis*); Ortópteros, p.ej., grillos y langostas; Isópteros, p.ej., termitas; Tisanópteros, p.ej. trips; Himenópteros, p.ej., hormigas y plagas de artrópodos del orden de los Acarina (ácaros). Moluscos (p.ej., babosa gris grande (*Decoceras reticulatum*); nematodos, en particular, *Mamestra brassicae*, escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*), mosca de bombilla del trigo (*Delia coarctata*) y el pulgón del cereal *Sitobion avenae*; la babosa gris grande (*Decoceras reticulatum*); como nematodos *Globodera* spp., nematodos formadores de agallas *Meloidogyne* spp., o nematodos formadores de quistes *Heterodera* spp.
10. Una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o una construcción de expresión que comprende una o más copias de la molécula de ácido nucleico.
11. Una célula hospedadora (como, por ejemplo, en la que la célula es *Pichia pastoris*) que comprende la molécula de ácido nucleico o construcción de expresión de la reivindicación 10.
12. Un método de preparación de una proteína de fusión, tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que comprende el cultivo de una célula hospedadora según se reivindica en la reivindicación 11 en condiciones adecuadas para la expresión de la proteína de fusión.

13. Una composición plaguicida que comprende una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
14. Un método de prevención o de tratamiento de infección de plaga de moluscos o nematodos (como pueden ser una babosa o un caracol) de una planta que comprende la aplicación de una cantidad de una proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9; o una composición plaguicida de reivindicación 13 que comprende dicha proteína de fusión a dicha planta o a su lugar de crecimiento; o la introducción en la planta de una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 10 que codifica dicha proteína de fusión.
15. Una planta transgénica o una progenie de la misma que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
16. Una planta transgénica o una progenie de la misma que comprenden una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
17. Uso de una proteína de fusión según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en la fabricación de un plaguicida o de una célula vegetal o de una planta transgénica.
18. Uso de un plaguicida de acuerdo con la reivindicación 13 o un método de acuerdo con la reivindicación 14 para destruir o debilitar una o más plagas de plantas, incluyendo insectos, moluscos, artrópodos, nematodos y moluscos, incluyendo Coleópteros p.ej., doradilla (*Diabrotica undecimpunctata*); gorgojo de la judía (*Callosobruchus maculatus*); Lepidópteros, p.ej., barrenador del maíz europeo (*Ostia nubilalis*); polilla del cuerno del tabaco (*Manduca sexta*); barrenador del tallo (*Chilo partellus*); plagas de Homópteros p.ej. saltamontes pardo del arroz (*Nilaparvata lugens*); saltamontes de las hojas verdes del arroz (*Nephotettix cinciteps*); saltamontes de la patata (*Empoasca fabae*); pulgón verde del melocotonero (*Myzus persicae*); pulgón del guisante (*Acyrtosiphon pisum*); Dípteros, p.ej., mosca amarilla de las cañas (*Chlorop pumilionis*); Ortópteros, p.ej., grillos y langostas; Isópteros, p.ej., termitas; Tisanópteros, p.ej. trips; Himenópteros, p.ej., hormigas y plagas de artrópodos del orden de los Acarina (ácaros). Moluscos (p.ej., babosa gris grande (*Decoceras reticulatum*); nematodos, en particular, *Mamestra brassicae*, escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*), mosca de bombilla del trigo (*Delia coarctata*) y el pulgón del cereal *Sitobion avenae*; la babosa gris grande (*Decoceras reticulatum*); nematodos como *Globodera* spp., nematodos formadores de agallas *Meloidogyne* spp. o nematodos formadores de quistes *Heterodera* spp.

Figura 1

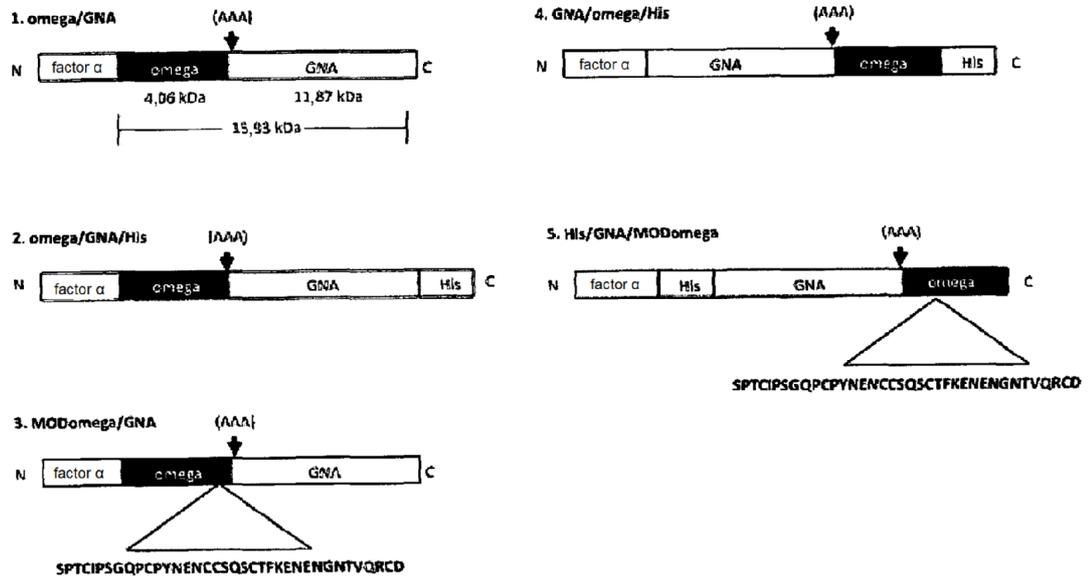


Figura 2

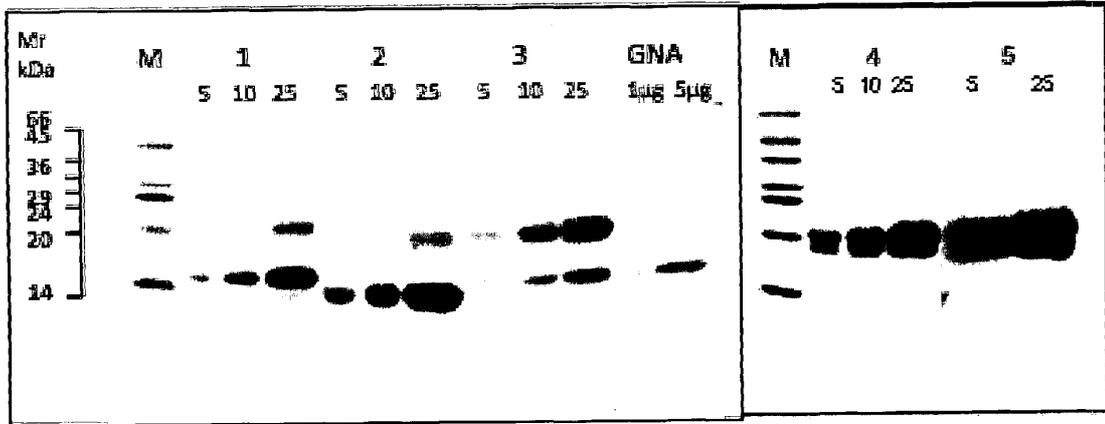


Figura 3

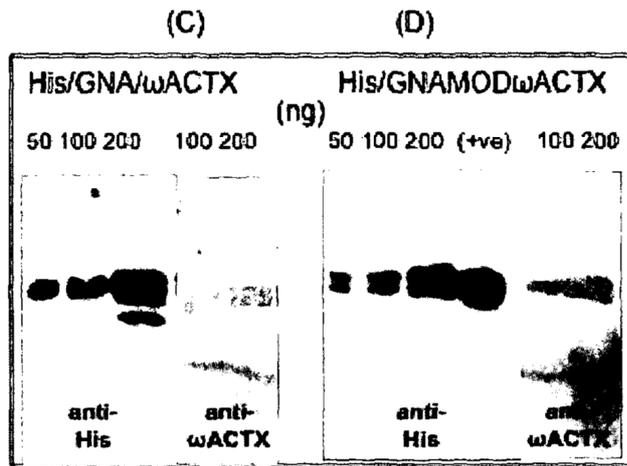
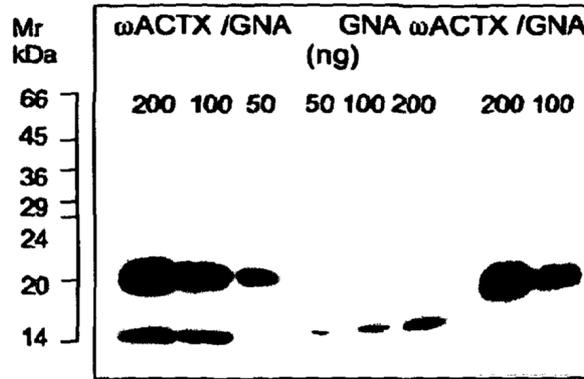


Figura 4

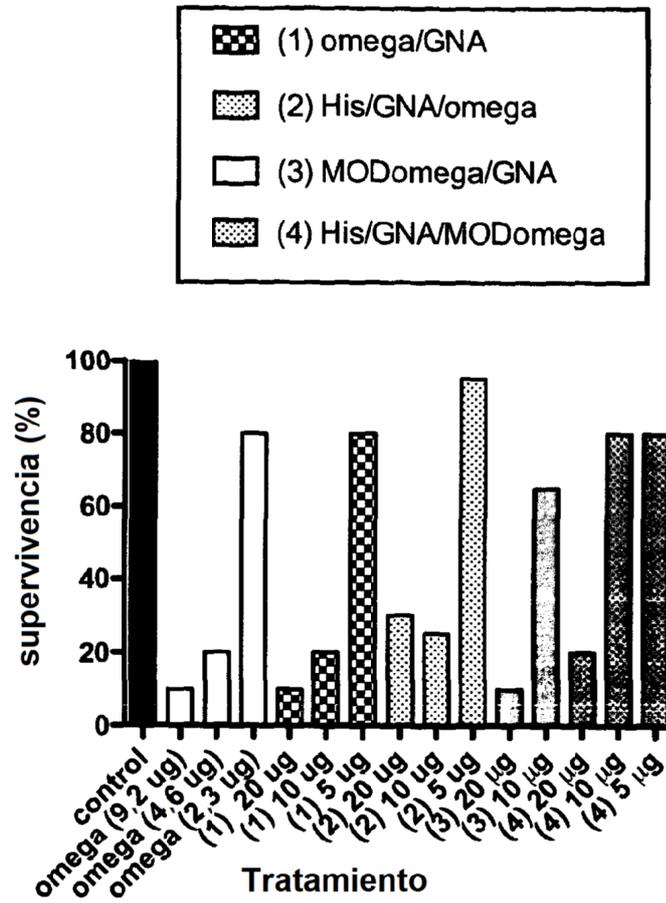


Figura 5

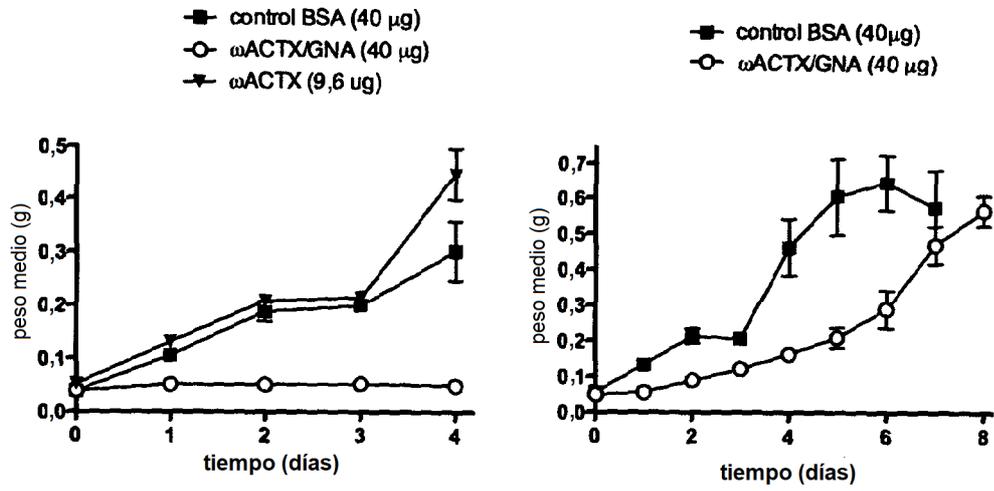


Figura 6

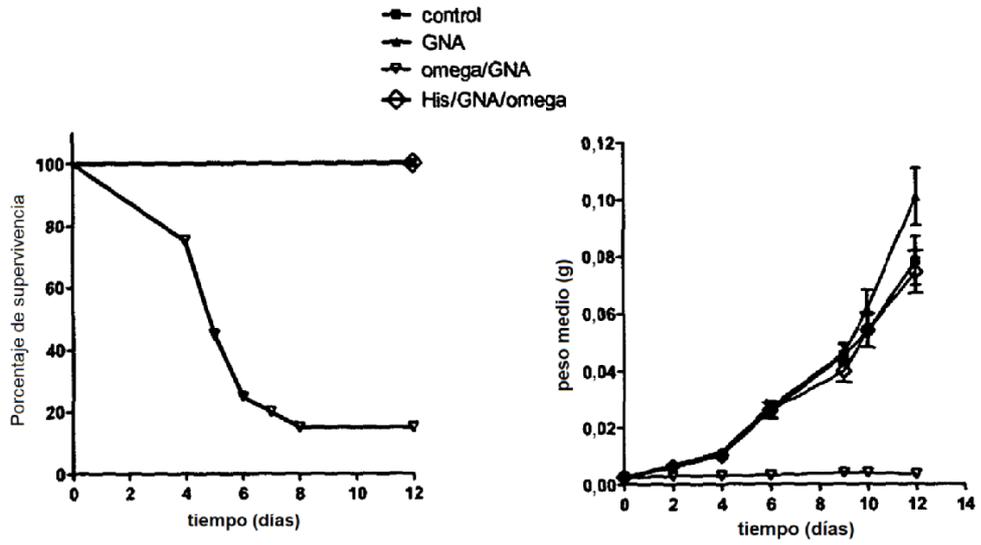


Figura 7

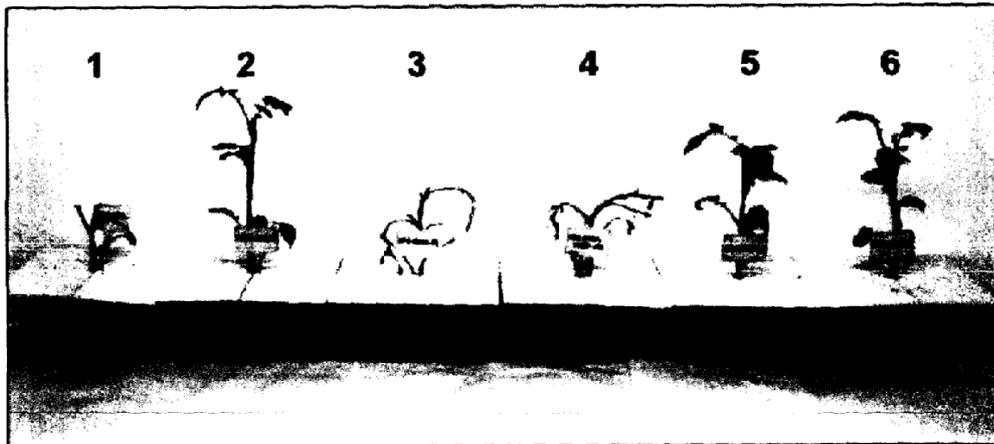


Figura 8

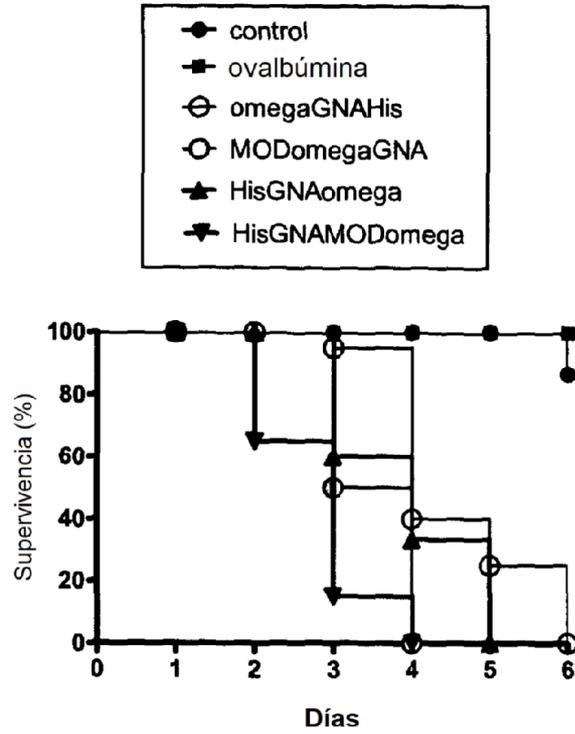


Figura 9

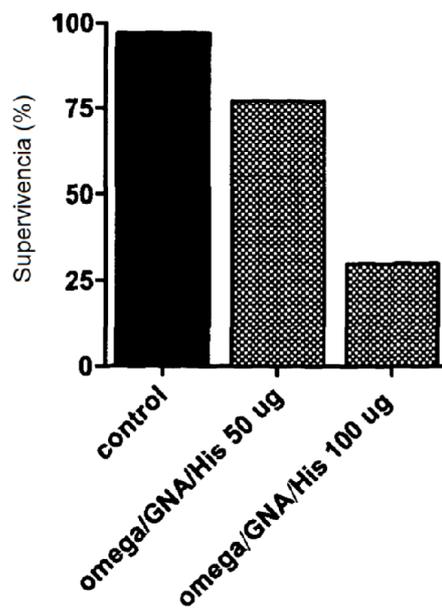


Figura 10

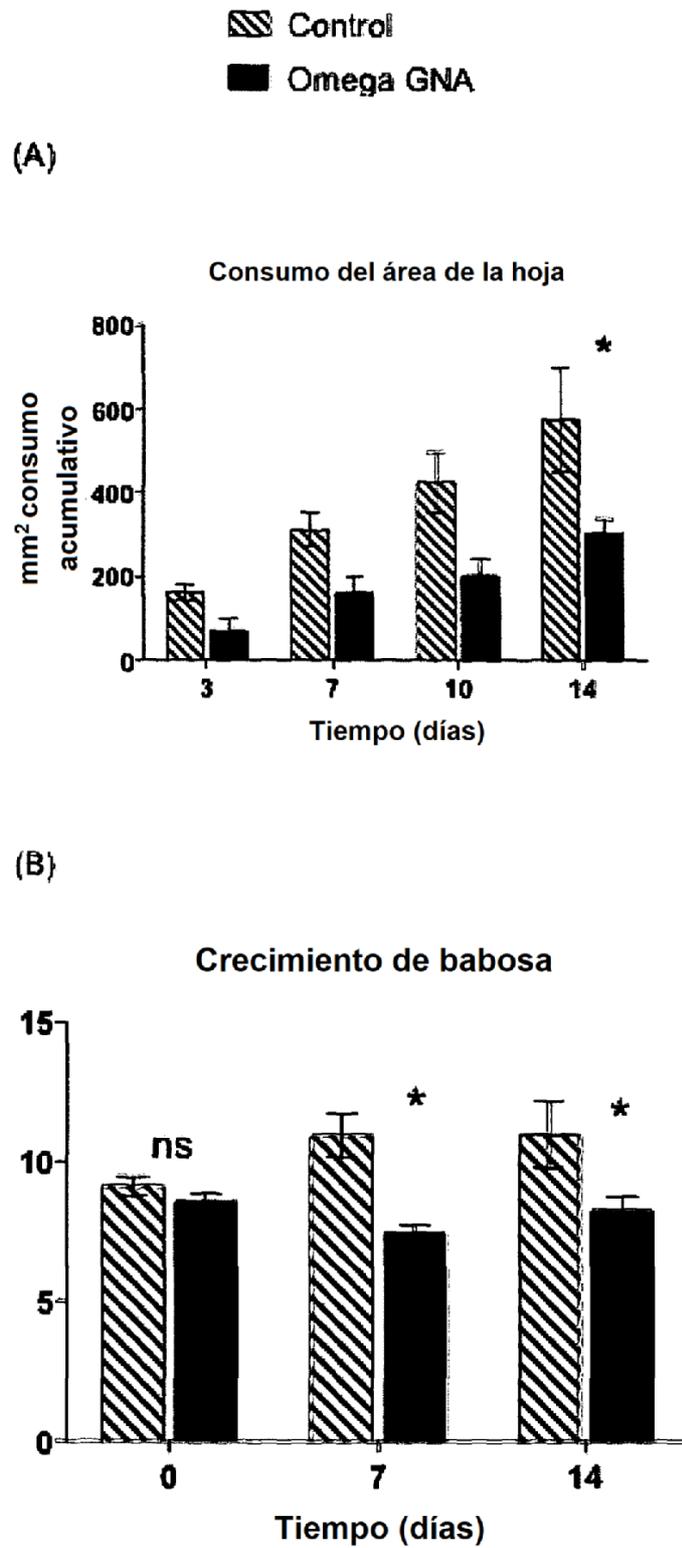


Figura 11

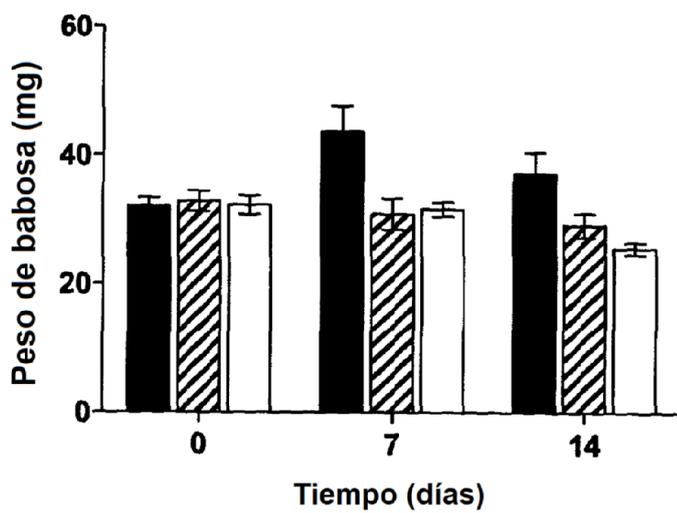
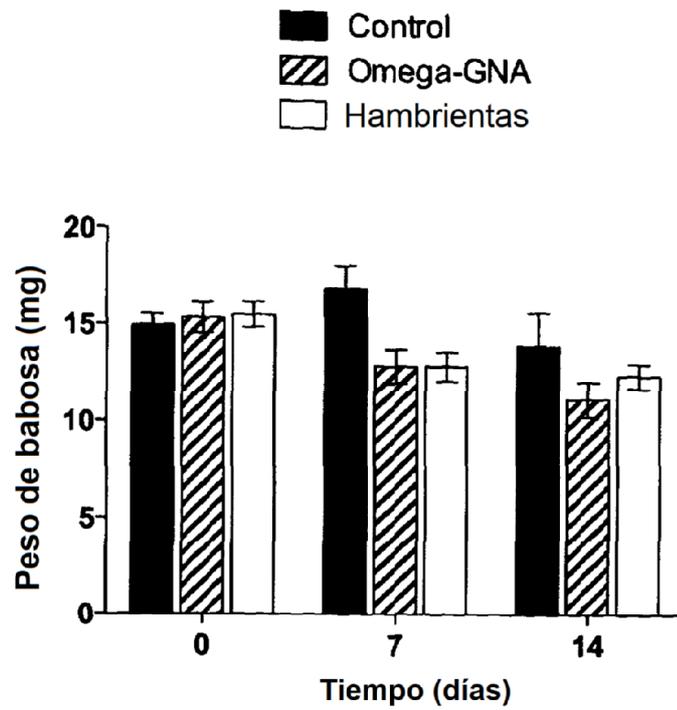


Figura 12

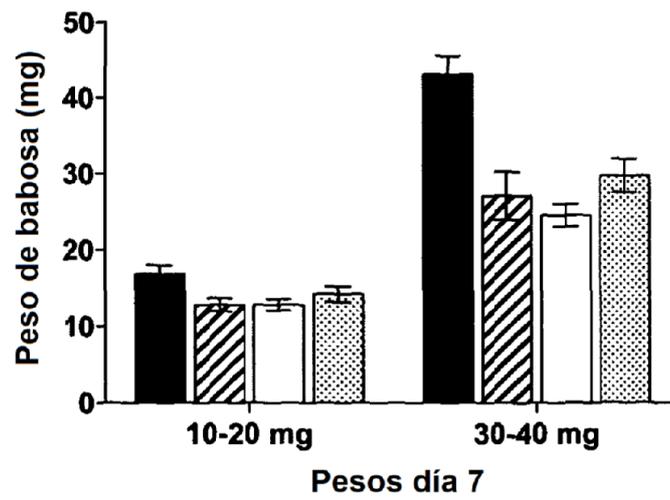
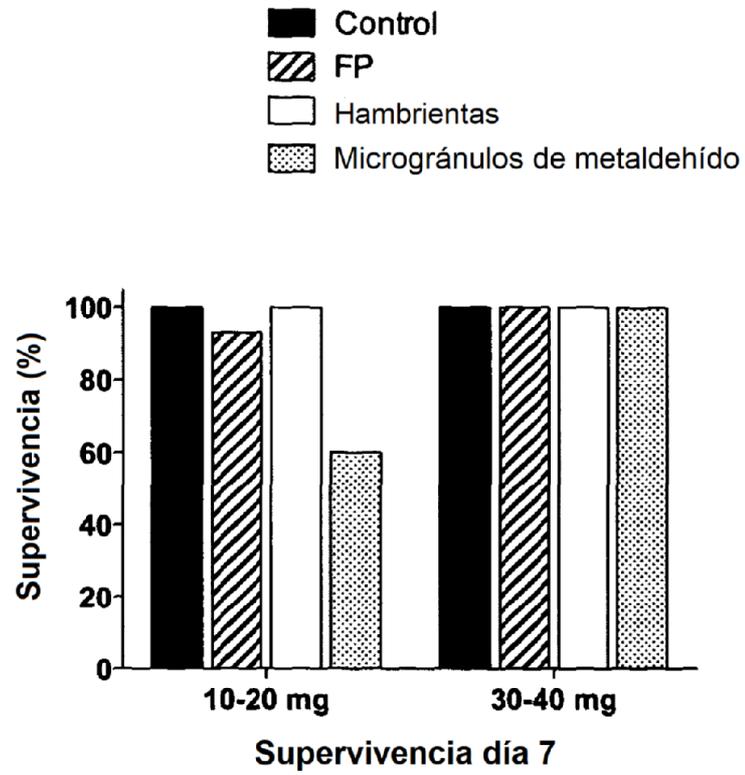


Figura 13

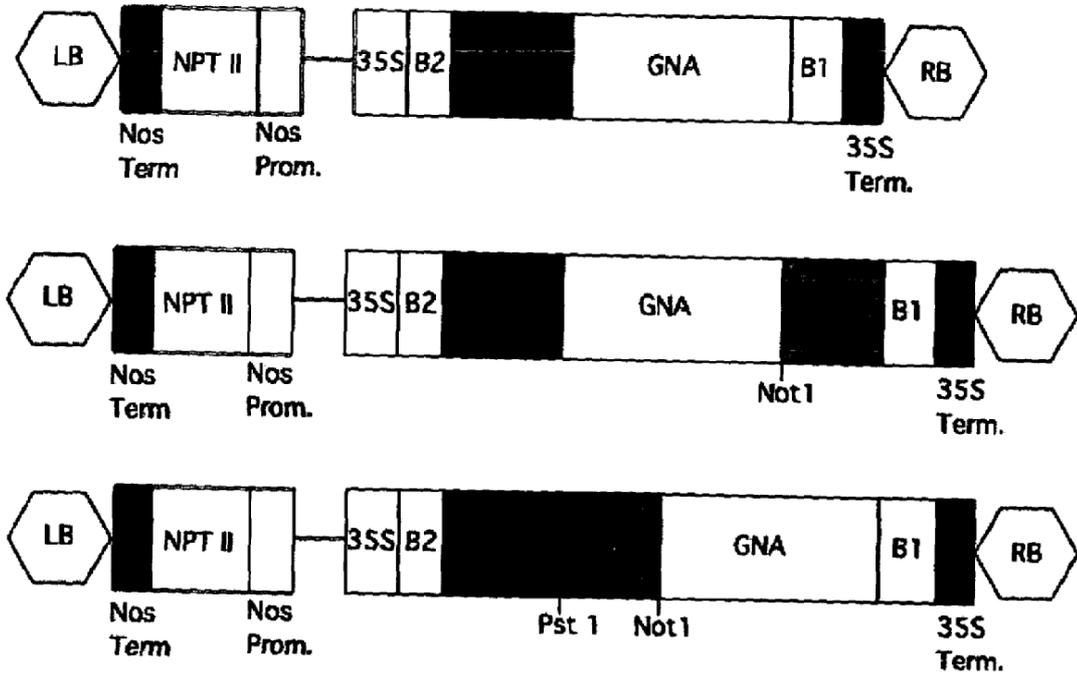


Figura 14

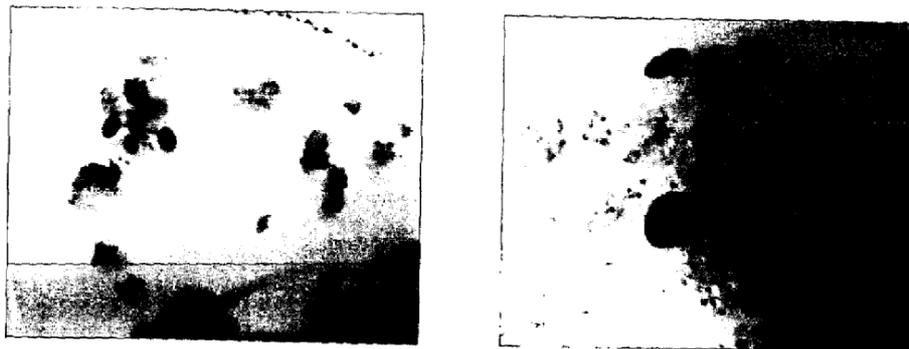


Figura 15

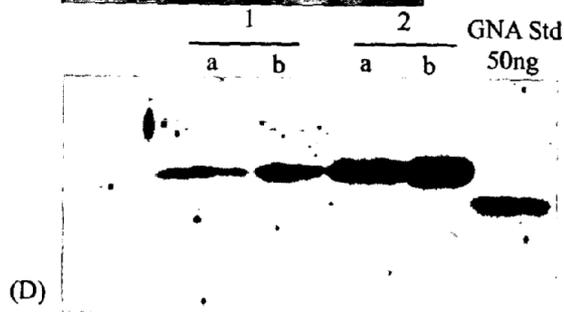
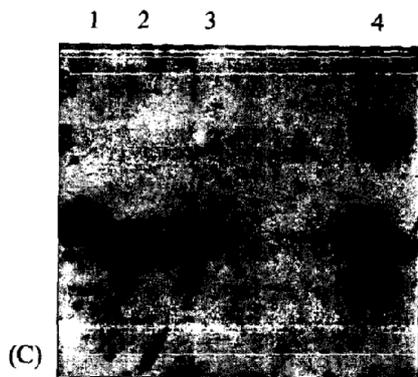
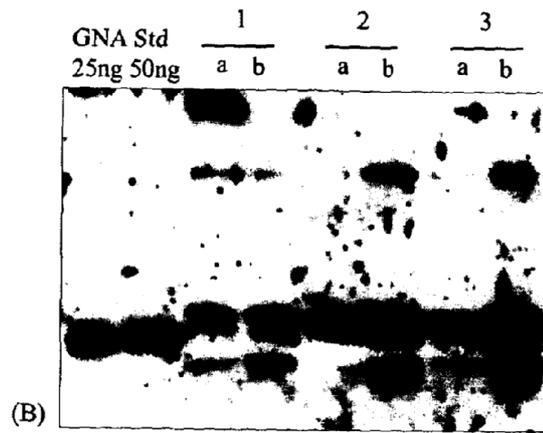
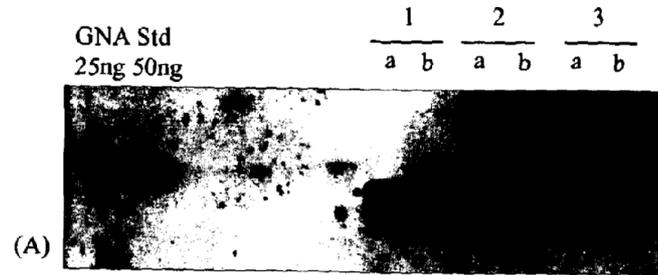


Figura 16

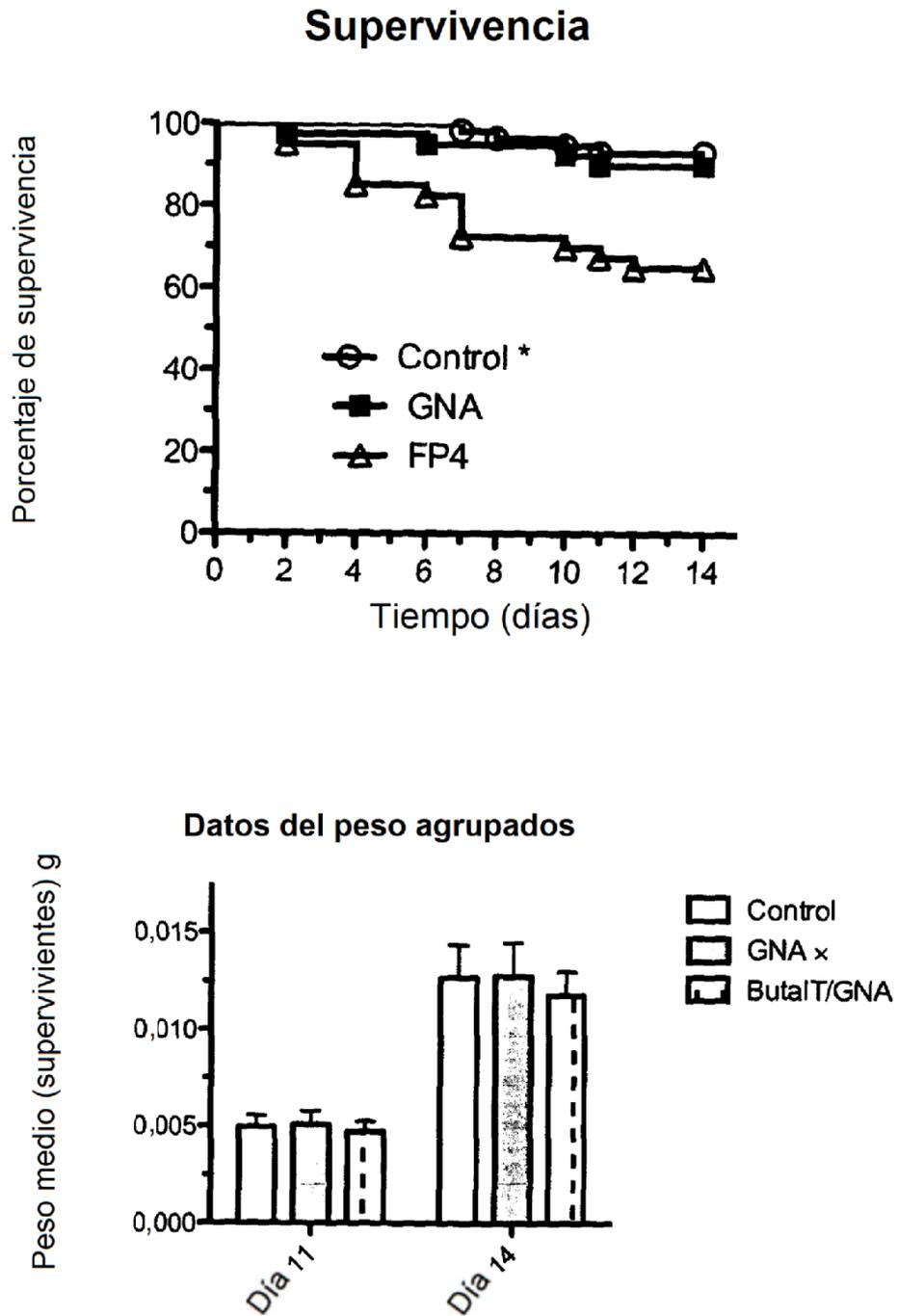


Figura 17

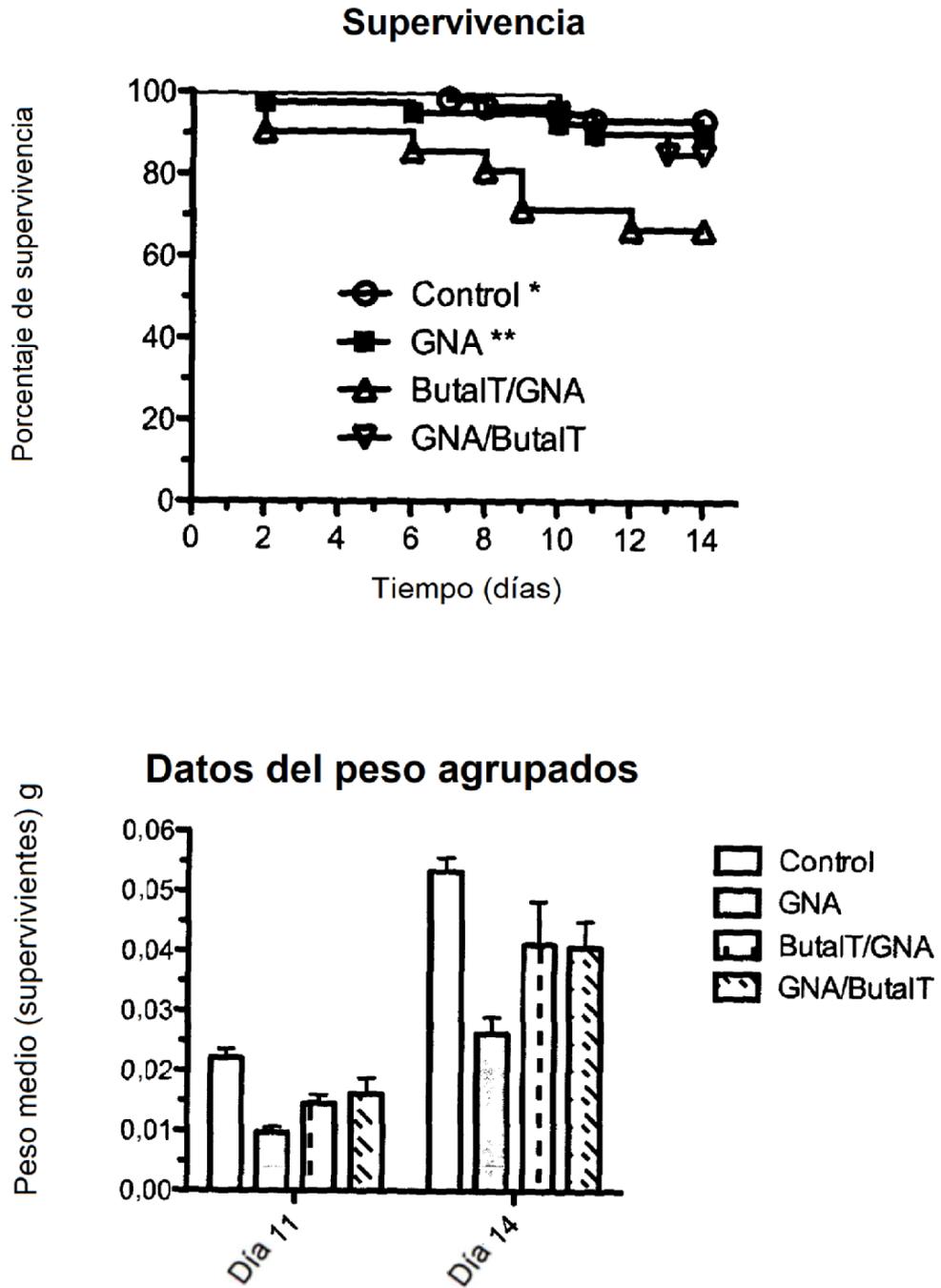


Figura 18

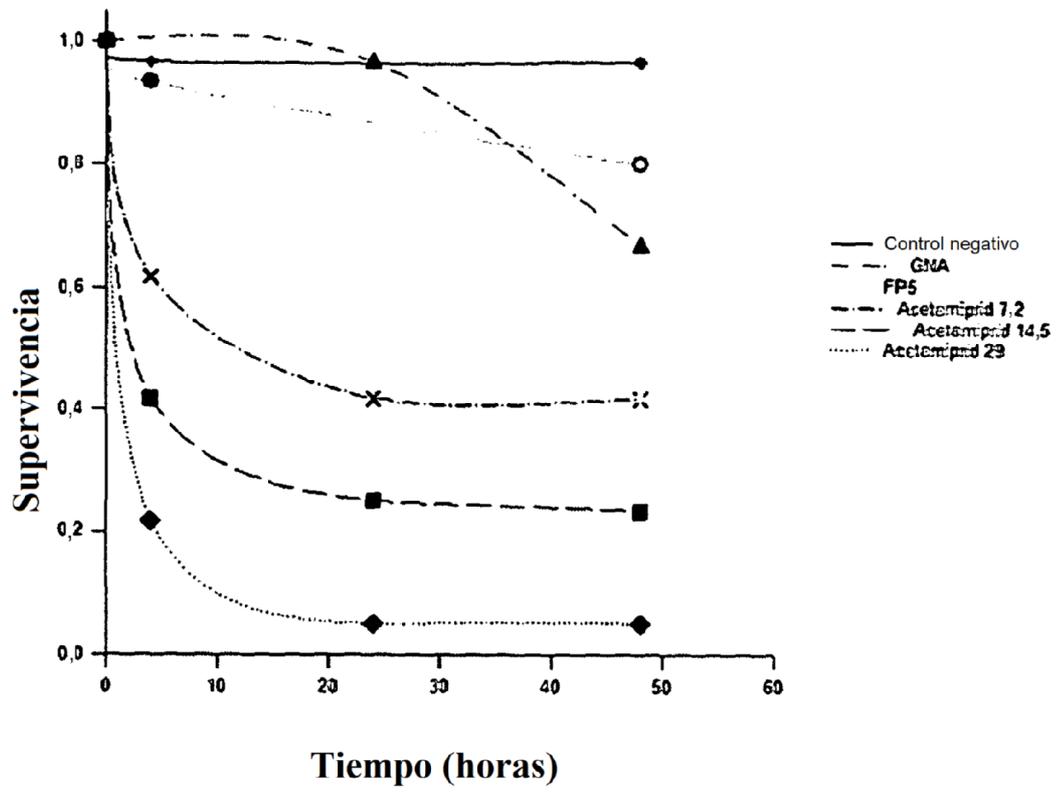


Figura 19

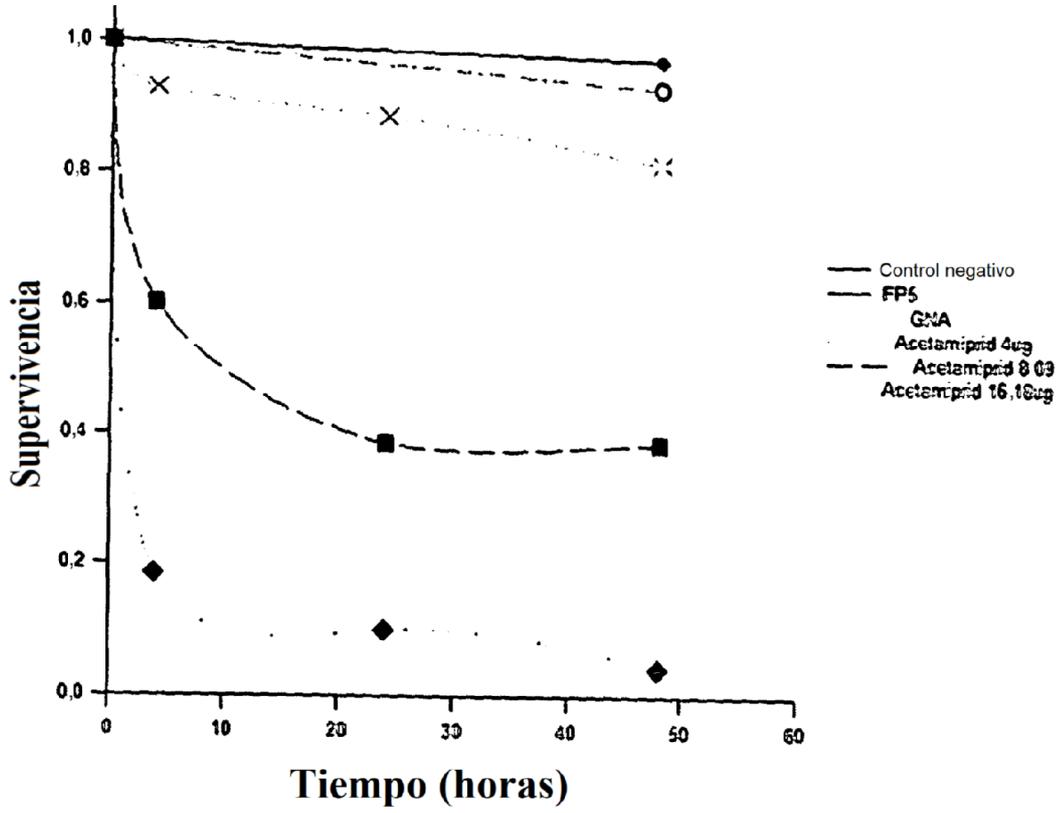


Figura 20 A

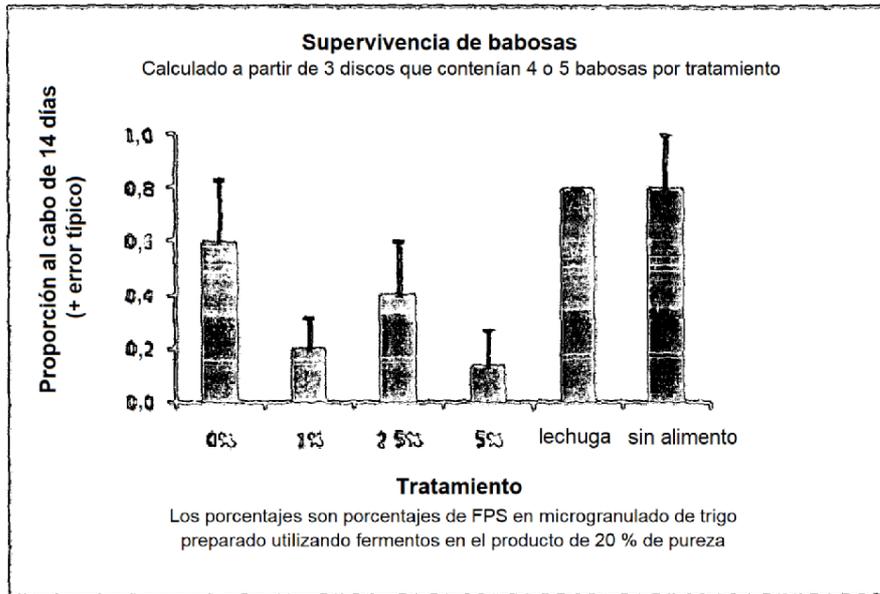


Figura 20 B

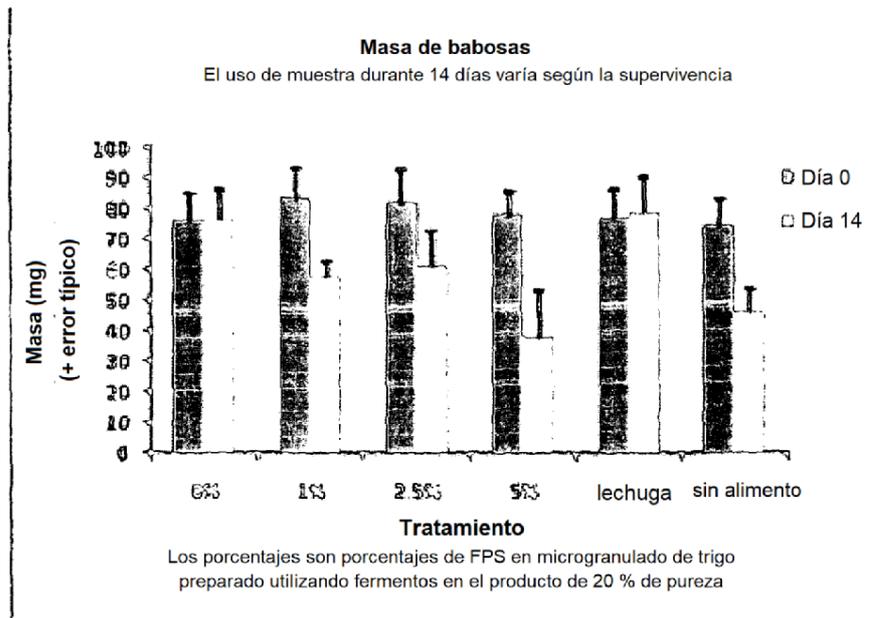
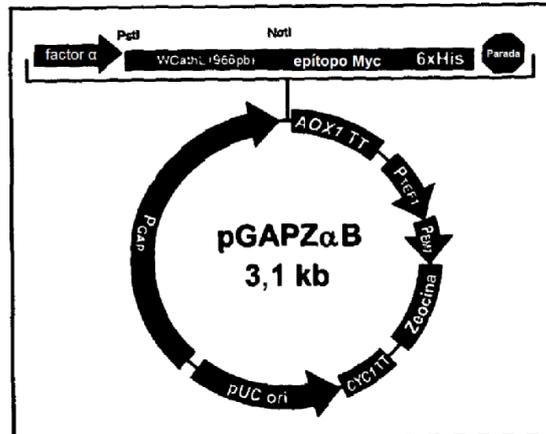


Figura 21

(A)



(B)

Vector PG



(C)

Vector PGH



Figura 22

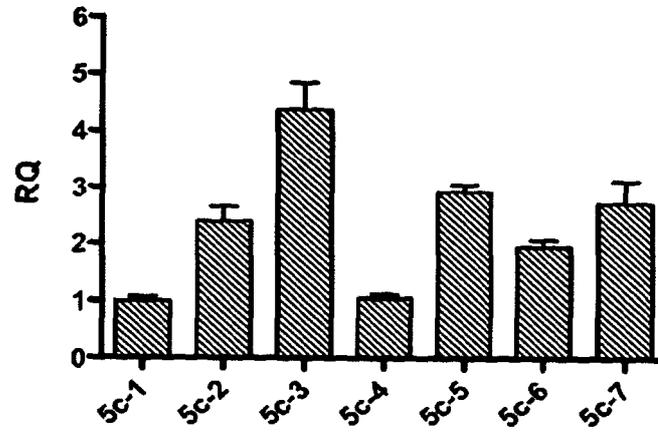


Figura 23

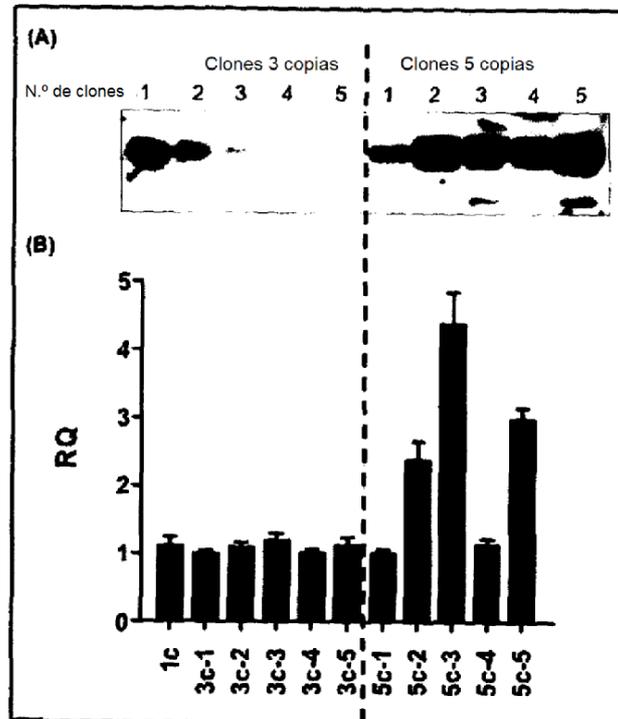


Figura 24

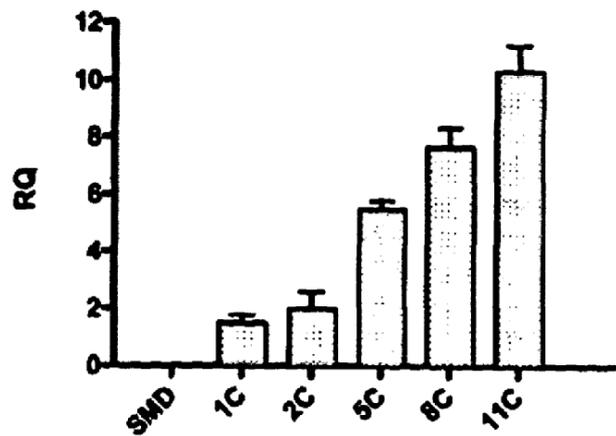


Figura 25

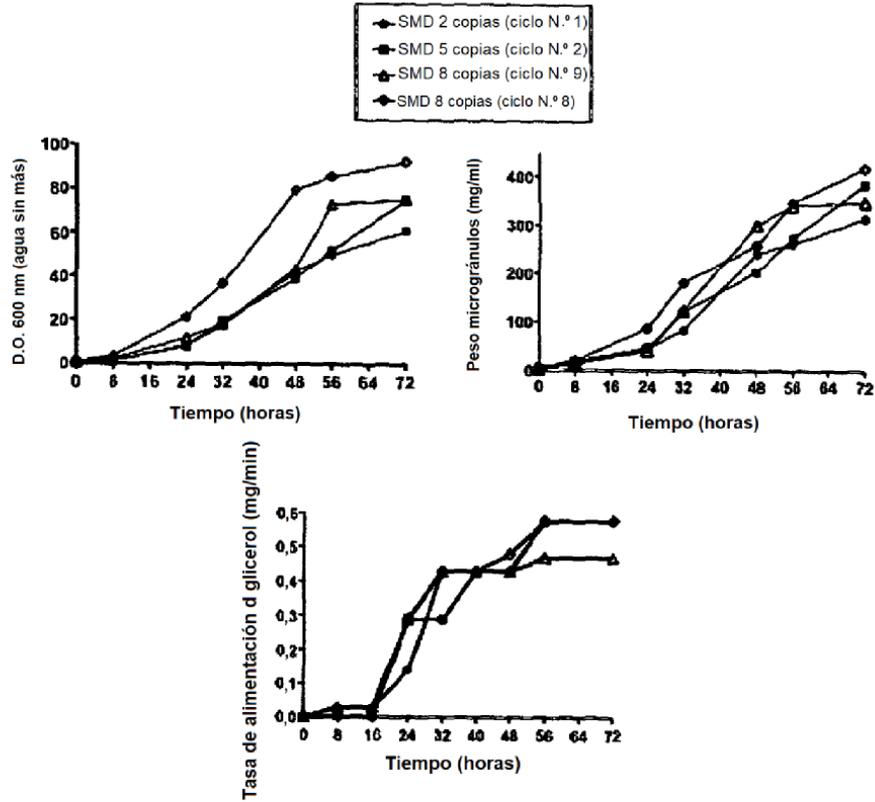


Figura 26

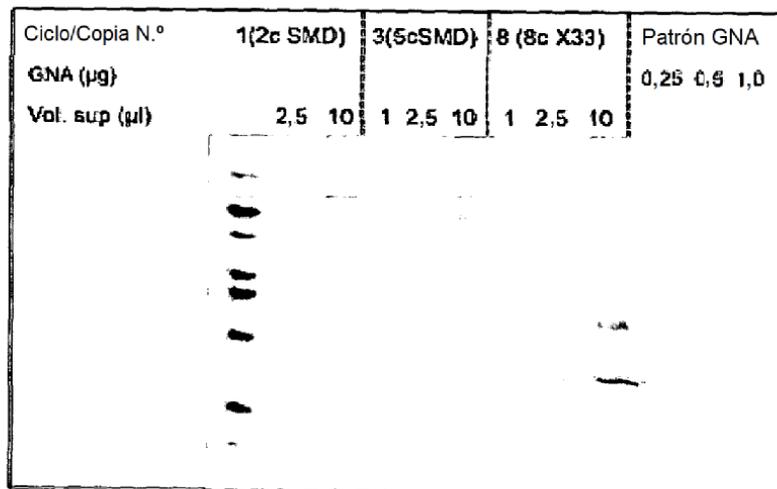


Figura 27

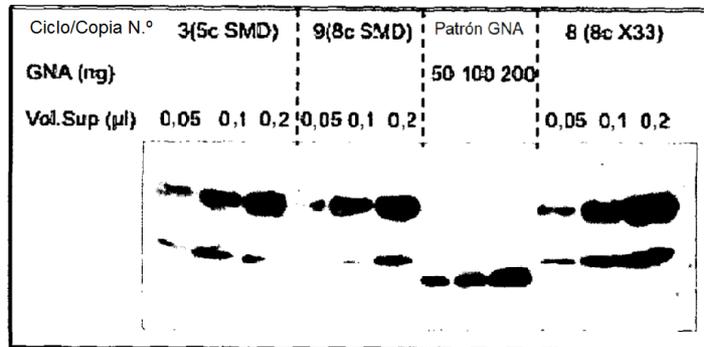
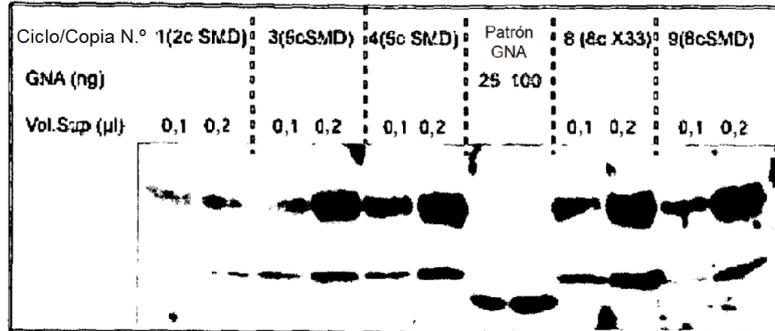


Figura 28

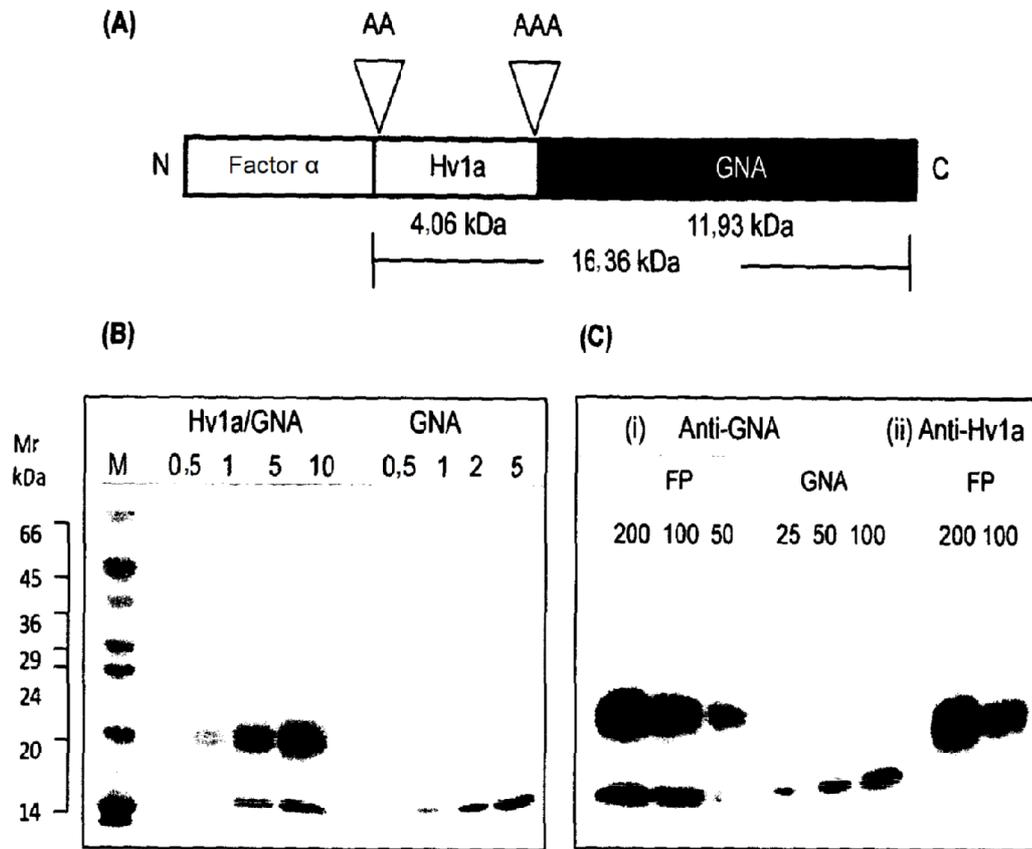


Figura 29

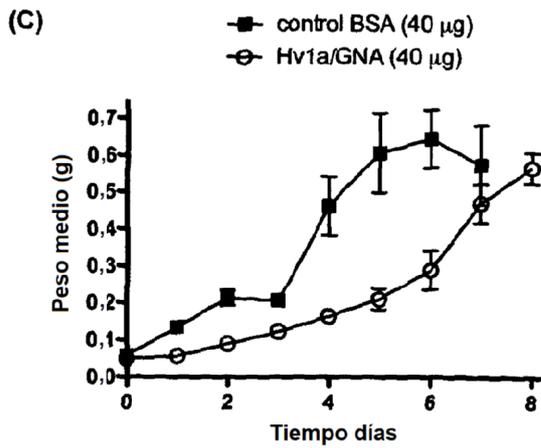
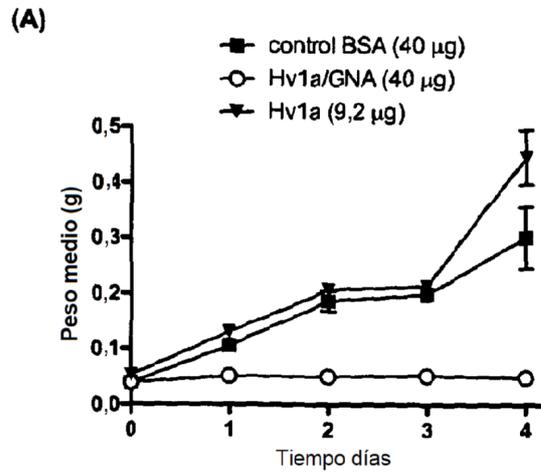


Figura 30

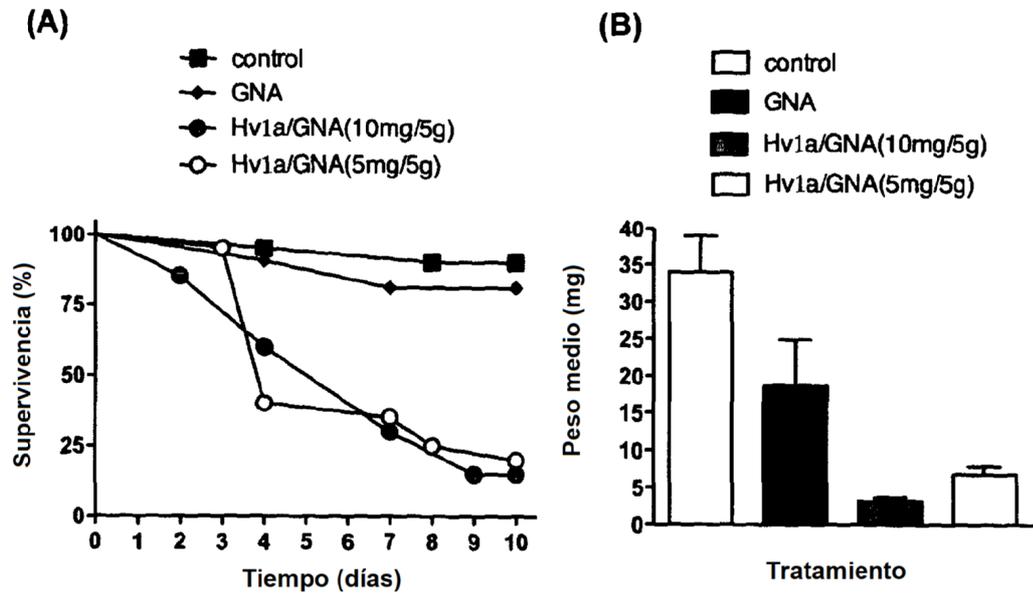


Figura 31

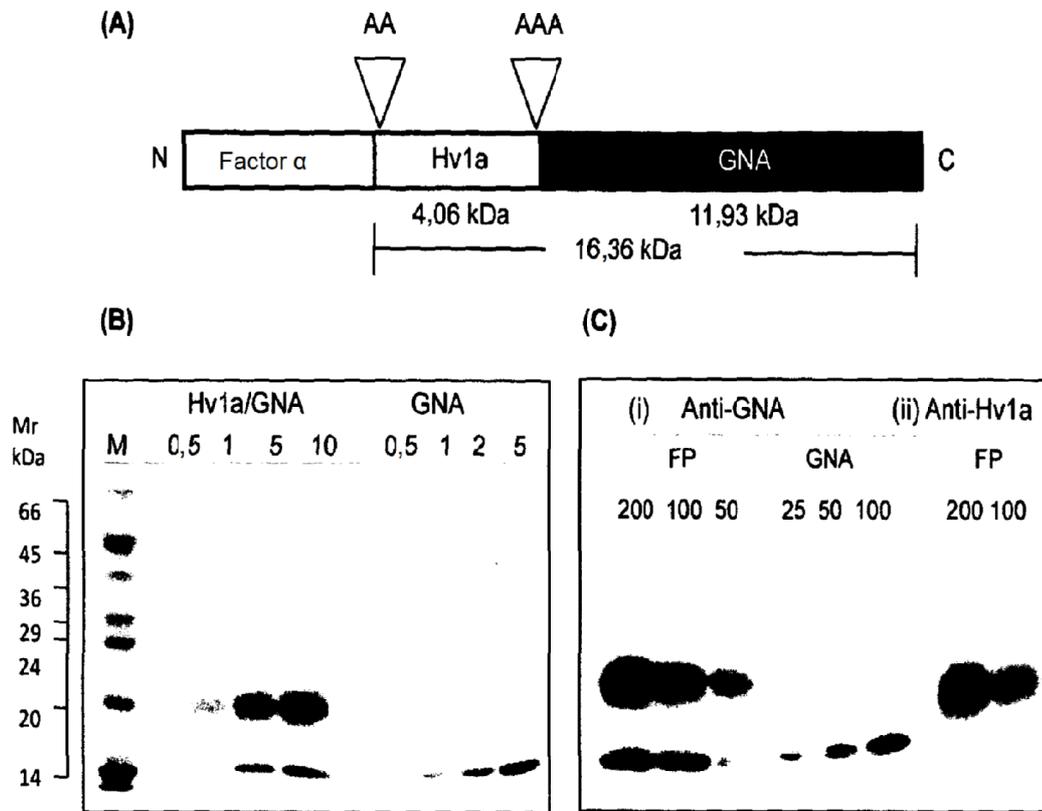


Figura 32

