

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 077**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/435** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.12.2014 PCT/GB2014/053663**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015 WO15087073**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2014 E 14821247 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 3087090**

54 Título: **Mejoras de proteínas de fusión pesticidas**

30 Prioridad:

**11.12.2013 GB 201321938**

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

**25.11.2020**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF DURHAM (50.0%)  
Palatine Centre, Stockton Road  
Durham DH1 3LE, GB y  
THE SECRETARY OF STATE FOR  
ENVIRONMENT, FOOD AND RURAL AFFAIRS  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**FITCHES, ELAINE CHARLOTTE;  
GATEHOUSE, JOHN ARTHUR;  
PYATI, PRASHANT SHIVASHARAN y  
YANG, SHENG**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 796 077 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

Mejoras de proteínas de fusión pesticidas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para aumentar la actividad biológica de toxinas recombinantes. La invención también se refiere a construcciones de ácido nucleico que contienen una pro-región y la secuencia de una toxina, en particular una toxina de artrópodo.

10

**Antecedentes de la invención**

En un contexto de aumento de la población mundial, las presiones para que los sistemas de producción de alimentos sean más eficientes son cada vez mayores. Las plagas siguen siendo una importante limitación en la producción de cultivos, a pesar de los avances en las medidas de protección de los cultivos. Las estimaciones sobre las posibles pérdidas a nivel mundial de los seis principales cultivos varían de 25-80 % (40 % en el caso de la patata). Algunas plagas y enfermedades pueden controlarse mediante la aplicación de productos agroquímicos. Sin embargo, a pesar del amplio intervalo de pesticidas disponibles en el mercado, la enfermedad de las plantas sigue siendo un importante motivo de preocupación.

15

20

En el pasado, la mayoría de las investigaciones sobre el desarrollo de pesticidas se centraron en la identificación de entidades químicas que pudieran utilizarse con este fin. Sin embargo, estos pesticidas específicos ajenos al objetivo suelen dar como resultado daños ambientales y pueden tener un impacto negativo en las especies ajenas al objetivo (incluidas las especies animales) y en la salud humana. Como resultado, se ha aprobado la legislación de la Unión Europea que prohíbe el uso de ciertos compuestos químicos en pesticidas. Ha habido, por lo tanto, un cambio hacia la identificación de nuevos tipos de "biopesticidas" que pueden utilizarse para la gestión de plagas. Los biopesticidas son generalmente considerados como sustancias de origen natural (pesticidas bioquímicos), microorganismos capaces de controlar plagas (pesticidas microbianos) y sustancias pesticidas producidas por plantas que contienen material genético añadido (protectores incorporados a las plantas). Es de esperar que este impulso hacia el desarrollo de biopesticidas se traduzca en opciones más respetuosas con el medio ambiente para evitar las enfermedades de las plantas.

25

30

Las toxinas neuropeptídicas sintetizadas como veneno por arañas y otros artrópodos han sido objeto de investigación para su desarrollo como biopesticidas. Los documentos WO2006/052806, WO2005/025313, WO 2013/026105 y US2007/0066529 describen el uso de péptidos procedentes del veneno de toxina de araña para su uso como biopesticida y Khan *et al.*, 2006 describieron la expresión de la toxina de veneno de araña en las plantas con el fin de proteger las plantas del ataque de insectos. Los presentes inventores han demostrado previamente que  $\omega$ -ACTX-Hv1a, una toxina derivada de la araña de tela de embudo *Hadroncyhe versuta*, cuando se fusiona con una proteína capaz de mediar en la translocación de la proteína de fusión del intestino de un invertebrado, tal como el "portador" de lectina de la campanilla de invierno GNA, puede funcionar como un pesticida eficaz contra un amplio intervalo de plagas (documento WO2012/131302 y Fitches *et al.*, 2012).

35

40

Las pro-regiones son un rasgo común de las toxinas peptídicas pequeñas en artrópodos y otros organismos. La predicción de pro-regiones en toxinas de artrópodos ya se ha demostrado previamente (Wong *et al.*, 2013).

45

**Sumario de la invención**

La presente invención se basa, en parte, en estudios realizados por los inventores sobre el efecto de la inclusión de una pro-región en una construcción para la expresión de una toxina recombinante en la actividad biológica de dicha toxina recombinante.

50

Los presentes investigadores deseaban determinar cómo se podría mejorar aún más la actividad biológica de las proteínas de toxinas recombinantes expresadas *in vitro*. Para investigar esto, los presentes inventores analizaron las secuencias de ADN de los genes que codifican las toxinas de los artrópodos. Las toxinas de artrópodos utilizadas en el documento WO2012/131302 son pequeñas proteínas ricas en cisteína que pertenecen a varias superfamilias de secuencias de proteínas (que incluyen toxinas procedentes de organismos distintos de los artrópodos). Los genes codificantes incluyen dos secuencias que no están presentes en el producto proteico final; un péptido señal N-terminal previsto que se elimina durante la traducción y una pro-región prevista, entre el péptido señal y la secuencia final de la proteína como aislado (véase la Figura 1A). Las pro-regiones son un rasgo común de las toxinas peptídicas pequeñas en artrópodos y otros organismos (Windley *et al.*, 2012). Los presentes inventores han descubierto de manera sorprendente que la inclusión de esta pro-región prevista en una construcción para la expresión de una toxina recombinante da como resultado una mayor actividad biológica en comparación con una toxina producida a partir de una construcción que carece de pro-región. Es más, la inclusión de una pro-secuencia en una construcción para la expresión de una toxina que no contiene naturalmente una pro-secuencia en su secuencia de ADN genómico (por ejemplo  $\delta$ -amaurobitoxina-PI1a) da como resultado nuevamente a una mayor actividad biológica en comparación con una toxina producida a partir de una construcción que carece de

55

60

65

prosecuencia.

Por consiguiente, en un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para aumentar la actividad biológica de una toxina recombinante, comprendiendo el método:

5 proporcionar una construcción de ácido nucleico que comprende:

10 (i) una secuencia de toxina de artrópodo, o una secuencia de un fragmento o variante biológicamente activo de la misma, conservando la variante al menos un 50 % de la actividad biológica de la toxina de artrópodo y teniendo una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 75 % de identidad con la secuencia de la toxina de artrópodo, operativamente vinculada a

(ii) una secuencia de ácido nucleico que codifica una pro-región de artrópodo; y

15 (iii) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora, o un fragmento o variante de la misma; y

expresar una proteína de fusión, comprendiendo la proteína de fusión la toxina de artrópodo o un fragmento o una variante biológicamente activo de la misma vinculado a la proteína portadora o a un fragmento o variante de la misma;

20 en la que la pro-región de artrópodo es una secuencia entre una secuencia de péptido señal y un extremo N-terminal de una proteína madura; y en la que la proteína portadora, fragmento o variante de la misma es capaz de mediar en la translocación de la proteína de fusión del intestino de un invertebrado.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona una construcción de ácido nucleico para aumentar la actividad biológica de una toxina recombinante que comprende:

(i) una secuencia de ácido nucleico que codifica una pro-región de artrópodo,

(ii) una secuencia de ácido nucleico de una proteína portadora, o un fragmento o variante de la misma; y

30 (iii) un sitio de restricción adyacente a la secuencia de ácido nucleico de la proteína portadora o un fragmento o variante de la misma, en la que una secuencia del gen de toxina de artrópodo, o una secuencia de un fragmento o variante biológicamente activo de la misma puede ser insertada dentro del marco, conservando la variante al menos un 50 % de la actividad biológica de la toxina de artrópodo y teniendo una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 75 % de identidad con la secuencia de la toxina de artrópodo;

35 en la que la pro-región de artrópodo es una secuencia entre una secuencia de péptido señal y un extremo N-terminal de una proteína madura; y en la que la proteína portadora, fragmento o variante de la misma es capaz de mediar en la translocación de la proteína de fusión del intestino de un invertebrado.

Las realizaciones son proporcionadas por las reivindicaciones dependientes.

40 En un aspecto relacionado de la invención, se proporciona un método para aumentar la actividad biológica de una toxina recombinante, comprendiendo el método:

45 proporcionar una construcción de ácido nucleico que comprende: (i) una secuencia de toxina, o un fragmento o variante de la misma, vinculado a ii) una pro-región, o a un fragmento o variante de la misma; y expresar opcionalmente la toxina recombinante.

También se describe una construcción de ácido nucleico que comprende: (i) una pro-región, o un fragmento o variante de la misma; y (ii) un sitio adyacente a la pro-región en el que se puede insertar una secuencia del gen de toxina, o un fragmento o variante de la misma.

50 La construcción de ácido nucleico puede comprender además la secuencia del gen de toxina o fragmento o variante de la misma insertado en el sitio adyacente a la pro-región.

55 En un aspecto relacionado de la presente invención, se proporciona una célula hospedadora que comprende la construcción de ácido nucleico descrita en la que se ha insertado una secuencia del gen de toxina, o cualquier realización de la misma.

60 También se describe un método para producir una toxina recombinante con una mayor actividad biológica, comprendiendo el método cultivar una célula hospedadora, tal como se define en el presente documento, en condiciones adecuadas para la expresión de la toxina recombinante.

La toxina de acuerdo con los aspectos mencionados anteriormente de la invención es una toxina pesticida. La toxina se deriva de los artrópodos.

65 La toxina es una toxina de artrópodo. Las toxinas de artrópodo de la presente invención pueden incluir  $\omega$ -ACTX-Hv1a y  $\kappa$ -ACTX-Hv1c de *Hadronyche versuta*,  $\delta$ -amaurobitoxina-PI1a de *Pireneitega luctuosus*, las toxinas Sfl 1-8 de

*Segestria florentina*, la toxina ButalT de *Buthus mesotamulus*, la terafotoxina Ec2a de *Eucratoscelus constrictus*, la cirtoautoxina As1a de *Apomastus schlingerii*, la sicaritoxina Li1a de *Loxosceles intermedia*, y otras toxinas similares.

5 La toxina de acuerdo con la presente invención puede comprender un péptido de 20-100 residuos de aminoácidos. La toxina puede contener múltiples residuos de cisteína que forman enlaces disulfuro internos.

10 En una realización, la toxina es  $\omega$ -ACTX-Hv1a, o un fragmento o variante de la misma. La toxina  $\omega$ -ACTX-Hv1a es conocida en la técnica (Fletcher *et al.*, 1997). Es una toxina aislada de la araña de tela de embudo *Hadroncybe versuta*. La secuencia de aminoácidos de  $\omega$ -ACTX-Hv1a es conocida, ya que es la secuencia de ácido nucleico que codifica  $\omega$ -ACTX-Hv1a. La toxina  $\omega$ -ACTX-Hv1a es un antagonista de los canales de calcio que ha demostrado previamente que bloquea los canales de calcio de los invertebrados, pero no de los vertebrados. En la mayoría de los casos, es deseable utilizar pesticidas que no tengan actividad contra animales vertebrados, de manera que se eviten efectos perjudiciales en humanos o animales.

15 Se ha notificado anteriormente que  $\omega$ -ACTX-Hv1a puede utilizarse de modo independiente como pesticida cuando se aplica tópicamente a las orugas (Khan *et al.*, 2006). Sin embargo, los autores del documento mencionado anteriormente notifican la aplicación tópica del péptido en una solución que contiene imidazol, conocida como insecticida por sí misma. Además, no se han notificado más pruebas sobre la actividad insecticida del péptido solo, con otras divulgaciones que abarcan  $\omega$ -ACTX-Hv1a solamente indicando la actividad por medio de inyecciones en  
20 animales invertebrados considerados como plagas.

25 Los presentes inventores han demostrado previamente que la actividad biológica de  $\omega$ -ACTX-Hv1 a recombinante puede ser mejorada mediante la creación de una proteína de fusión, con lo cual la toxina  $\omega$ -ACTX-Hv1 a se fusiona con un péptido "portador" que puede mediar en la translocación de la proteína de fusión del intestino de un invertebrado (documento WO2012/131302). Los inventores utilizaron la lectina vegetal GNA como ejemplo de tal péptido portador.

30 Para investigar cómo la actividad biológica de las proteínas de fusión de toxinas recombinantes podría mejorarse de otra manera, los presentes inventores analizaron las secuencias de ADN de los genes que codifican las toxinas de los artrópodos, en particular  $\omega$ -ACTX-Hv1a. Se descubrió que muchos genes de artrópodo contenían una pro-región prevista, no presente en la proteína final, que no se había incorporado previamente en construcciones para expresar proteínas de fusión *in vitro*. Como se puede observar en el presente documento, los inventores incorporaron la secuencia de la pro-región en una construcción de ácido nucleico para la producción de una proteína de toxina recombinante. Los inventores descubrieron que una  $\omega$ -ACTX-Hv1a recombinante producida a partir de una  
35 construcción que contenía una pro-región administrada a una serie de plagas de invertebrados, ya sea por inyección o cuando se incluía en la dieta, daba lugar a un aumento de la parálisis y la mortalidad en comparación con la producción de  $\omega$ -ACTX-Hv1a recombinante a partir de una construcción no modificada (es decir, que contenía la secuencia de  $\omega$ -ACTX-Hv1a sin una pro-región adicional). Por lo tanto, la toxina peptídica  $\omega$ -ACTX-Hv1a puede ser muy eficaz como pesticida para animales invertebrados cuando se suministra en esta forma.

40 Como se usa en el presente documento, y como se explica adicionalmente más adelante, "pesticida" se refiere a una sustancia química, agente biológico (tal como un virus o una bacteria), antimicrobiano, desinfectante o dispositivo utilizado contra cualquier plaga. Las plagas incluyen insectos, patógenos de plantas, malezas, moluscos, aves, mamíferos, peces, nematodos (ascárides), y microbios que destruyen terrenos, propagan enfermedades o son un vector de enfermedades o causan una molestia. Sin embargo, para la presente invención, por "pesticida" se entiende que la plaga es cualquier animal invertebrado que destruye terrenos, particularmente los productos básicos agrícolas.

50 En una realización alternativa, la invención puede comprender la toxina  $\delta$ -amaurobitoxina-PMa, o un fragmento o variante de la misma.

55 La toxina  $\delta$ -amaurobitoxina-PMa proviene de la araña *Pireneitega luctuosa* y no contiene una pro-región prevista en su secuencia de gen endógeno. De manera sorprendente, los presentes inventores han descubierto que incluir una pro-región (diseñada sobre la base de secuencias similares presentes en la base de datos mundial) en una construcción de expresión para la  $\delta$ -amaurobitoxina-PMa recombinante da como resultado una toxina recombinante con una mayor actividad biológica contra las plagas de invertebrados. Este hallazgo inesperado demuestra que la presente invención puede utilizarse para aumentar la actividad biológica de las toxinas recombinantes que no contienen pro-regiones asociadas con sus secuencias de genes endógenos al diseñar e incorporar pro-regiones en construcciones de expresión.

60 Aunque sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que la inclusión de una pro-región en la construcción de ácido nucleico, da como resultado un mejor plegado de la toxina cuando se expresa *in vitro*.

65 Por "fragmento o variante" se incluye que la secuencia de la toxina de la invención puede variar de la secuencia de origen natural con la condición de que el fragmento o variante conserve al menos un 50 % de la actividad biológica de la toxina. Por conservar la actividad biológica de la toxina se entiende que el fragmento y/o variante conserva al

menos una porción de la actividad pesticida en comparación con la toxina nativa. Normalmente el fragmento y/o variante conserva al menos un 80 o 90 % de actividad. En algunos casos, el fragmento y/o variante pueden tener una mayor actividad pesticida que la toxina nativa. En algunas realizaciones, el fragmento y/o variante pueden mostrar un aumento de otro rasgo fisiológico en comparación con la toxina nativa. Por ejemplo, el fragmento y/o variante pueden poseer una mayor semivida *in vitro* y/o *in vivo*, en comparación con la toxina nativa.

Por "variantes" de una secuencia se incluye inserciones, deleciones y sustituciones, ya sean conservadoras o no conservadoras. En particular, se incluyen variantes de la secuencia de nucleótidos en las que tales cambios no alteran sustancialmente la actividad biológica de la toxina. Un experto en la materia sabría que tales secuencias pueden ser alteradas sin la pérdida de actividad biológica. En particular, los únicos cambios en la secuencia de nucleótidos pueden no dar lugar a una secuencia de aminoácidos alterada tras la expresión de la secuencia. Es más, si los cambios en la secuencia de nucleótidos dan como resultado la incorporación de un aminoácido alternativo, pero en la que las propiedades fisicoquímicas del(los) respectivo(s) aminoácido(s) no se modifican sustancialmente (por ejemplo, sustituciones conservadoras tales como Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe, Tyr), la funcionalidad de la toxina respectiva no debe verse afectada. Además, se pueden tolerar también deleciones pequeñas dentro de las regiones no funcionales de la toxina y, por ende, se consideran "variantes" para los fines de la presente invención. Las "variantes" también incluyen proteínas de toxinas recombinantes en las que los aminoácidos han sido modificados postraduccionalmente, por ejemplo, mediante, glicosilación, o formación de enlaces disulfuro. Los procedimientos experimentales descritos en el presente documento pueden ser adoptados con facilidad por el experto en la materia para determinar si una "variante" puede seguir funcionando como toxina.

La variante tiene una secuencia que tiene al menos 75 %, incluso aún más preferentemente al menos 80 %, con mayor preferencia al menos 85 %, con una preferencia aún mayor, al menos 90 % y, lo más preferentemente, al menos 95 % o 97 % de identidad con la secuencia de nucleótidos "de origen natural" de la toxina.

La presente invención se refiere a toxinas de artrópodo. Las toxinas de artrópodo investigadas por los presentes inventores son pequeñas proteínas ricas en cisteína que pertenecen a varias superfamilias de secuencias de proteínas. Las secuencias génicas de algunas de estas toxinas contienen secuencias que no están presentes en el producto proteico final. Estas secuencias adicionales incluyen un péptido señal N-terminal previsto que se elimina durante la traducción, y una pro-región prevista, entre el péptido señal y la secuencia final de la proteína como aislado (véase la Figura 1A).

La mayoría de las toxinas peptídicas pequeñas ricas en cisteína se traducen inicialmente como precursores más grandes (70-120 aminoácidos) que contienen un péptido señal N-terminal conservado (de aproximadamente 20 aminoácidos), eliminado durante la traducción, una pro-región (de aproximadamente 15-60 aminoácidos) que muestra una importante conservación de la secuencia dentro de las familias de proteínas, y una región de codificación de la toxina en el extremo C-terminal que da lugar a la toxina madura y es más variable.

Las pro-regiones se han predicho a partir de las secuencias de ADNc que codifican muchas toxinas, y en general son menos variables que las secuencias de toxinas maduras cuando se comparan entre miembros de las familias de proteínas, aunque no se han identificado motivos de secuencias como los que se encuentran en los péptidos señal. La pro-región es, sin embargo, a menudo rica en residuos de aminoácidos ácidos (Tedford *et al.*, 2004). Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la pro-región asociada con la toxina  $\omega$ -ACTX-Hv1a es:

La secuencia de aminoácidos de la pro-región asociada con la toxina Ao1b es:  
ISYEEGKELFQKER

Las pro-regiones pueden ser identificadas comparando la secuencia determinada para una proteína aislada de su fuente normal con la secuencia prevista por el gen que la codifica. Tal comparación puede mostrar si una etapa de proteólisis o de escisión ha tenido lugar co- o postraduccionalmente para obtener el producto proteico final. Las pro-regiones son eliminadas del extremo N-terminal de una proteína madura; sin embargo, difieren de los péptidos señal que participan en el enrutamiento de los polipéptidos en las vías de secreción. Los péptidos señal pueden ser identificados utilizando un algoritmo de software tal como SignalP\* (Nielsen *et al.*, 1997) basándose en la secuencia de proteínas prevista por el gen. Para identificar una pro-región, la secuencia de proteínas directamente determinada se compara primero con la secuencia prevista para mostrar que una región es eliminada del extremo N-terminal; la presencia de un péptido señal es entonces determinada por la predicción del software; la pro-región puede entonces ser identificada como la región de la secuencia entre el péptido señal y el extremo N-terminal de una proteína madura. Se pueden predecir pro-regiones en las toxinas de artrópodo, basándose en los conceptos descritos anteriormente, utilizando el software (SpiderP) disponible gratuitamente en la base de datos de Arachnoserver (<http://www.arachnoserver.org/spiderP.html>; Wong *et al.*, 2013). Este método de máquinas de soporte vectorial (MSV) utiliza un algoritmo específicamente diseñado para combinar información de secuencias tanto locales como globales.

Las pro-regiones identificadas mediante el uso de los métodos mencionados anteriormente pueden ser utilizadas en

la presente invención. La pro-región de los aspectos mencionados anteriormente de la invención puede asociarse con la toxina de la invención en su secuencia de origen natural. Como alternativa, la secuencia de una pro-región puede diseñarse basándose en las secuencias disponibles en las bases de datos mundiales, o identificarse basándose en los métodos mencionados anteriormente, e incorporarse en construcciones de ácido nucleico de toxinas que no están asociadas con las pro-regiones normalmente (es decir, en la secuencia de origen natural) o asociadas con una pro-región diferente en la secuencia de origen natural.

En una realización de la invención, la pro-región comprende la secuencia de aminoácidos EDTRADLQGGEEAEKVFRR, o un fragmento o variante de la misma.

En una realización adicional de la invención, la pro-región comprende la secuencia de aminoácidos ISYEEGKELFQKER, o un fragmento o variante de la misma.

Por "fragmento o variante" de la pro-región se incluye que la secuencia de ácido nucleico de la pro-región puede diferir de la conocida en la técnica y de la de origen natural, con la condición de que el fragmento o variante conserve sustancialmente la actividad biológica de la pro-región, es decir, que siga siendo capaz de mejorar la actividad biológica de la toxina con la que se asocia.

En los ejemplos adjuntos, los inventores han mostrado que la pro-región puede ser eliminada durante la expresión, de tal manera que no está presente en la proteína final o en la proteína de fusión. Sin embargo, debe apreciarse que una proteína/proteína de fusión en la que se conserva la pro-región después de la expresión sigue estando dentro del alcance de la presente invención.

Las construcciones de ácido nucleico de acuerdo con los aspectos mencionados anteriormente de la invención, y cualquier realización de los mismos, contienen la secuencia de una proteína capaz de mediar en la translocación de la proteína producida a partir de la construcción del intestino de un invertebrado (una proteína "portadora") o un fragmento o variante de la misma. Tales secuencias pueden fusionarse con la secuencia de proteína de toxina, generando así una proteína de fusión. Cualquier proteína que se une al intestino del insecto puede ser utilizada como proteína portadora, siempre y cuando sea estable en las condiciones que se encuentran en el intestino y no sea tóxica para los mamíferos.

Las proteínas adecuadas capaces de funcionar como proteínas portadoras incluyen lectinas. Generalmente, puede ser utilizada cualquier lectina que se une al intestino del insecto. En una realización de la invención, las proteínas portadoras son lectinas vegetales.

Los inventores han demostrado previamente que ciertas lectinas vegetales son resistentes a la proteólisis intestinal y tienen el potencial de actuar como vehículos para suministrar otros péptidos desde el intestino al sistema circulatorio de las especies diana. Los presentes inventores también han demostrado que la fusión de lectinas vegetales con una toxina ayuda a la translocación a través de la pared intestinal de una plaga de invertebrados, aumentando de este modo la actividad biológica de la toxina, y permitiendo que tal proteína de fusión sea utilizada como pesticida.

Una realización preferida de la invención es aquella en la que la proteína portadora es una lectina vegetal seleccionada entre una cualquiera de las siguientes: lectina de la campanilla de invierno (GNA), lectina de ajo *Allium sativum*, lectina de guisante *Pisum sativum* (P-lec), lectina de cacahuete *Arachis hypogaea*, lectina de judía verde (PHA, *Phytohaemagglutinin*), o un fragmento o variante de las mismas.

Por "fragmento o variante" de la lectina vegetal se incluye que la secuencia de ácido nucleico de la lectina particular puede diferir de la conocida en la técnica y de la de origen natural, con la condición de que el fragmento o variante conserve sustancialmente la actividad biológica de la lectina, es decir, que sea capaz de mediar en la translocación de la proteína de fusión del intestino de un invertebrado.

En una realización preferida, la lectina es GNA. Los inventores han demostrado de manera sorprendente en los ejemplos adjuntos que una proteína de toxina producida a partir de una construcción de ácido nucleico que contiene la secuencia de una toxina, además de una pro-región y la secuencia de GNA, da como resultado una mayor actividad biológica contra las plagas de invertebrados en comparación con solo la toxina, una toxina acoplada solo a GNA y una toxina acoplada solo a una pro-región. Si bien se espera que la adición de una pro-región, o una fusión a otra proteína podría cada una de ellas aumentar la actividad biológica de una toxina recombinante, no se esperaría que una combinación de ambas modificaciones produjera un efecto aditivo. Se consideró que ambas modificaciones conducirían al mismo resultado, a saber, al correcto plegado de la proteína, y por lo tanto a la modificación, o ambos, conducirían a la misma mejora de la actividad biológica. Los inventores han demostrado que no parece ser el caso. Como se apreciará, un material de partida para la producción de una construcción de ácido nucleico que comprende (i) una secuencia de toxina de artrópodo, (ii) una pro-región y (iii) una secuencia de proteína portadora es una construcción de ácido nucleico que consiste en (i) una pro-región y (ii) una secuencia de proteína portadora.

Por consiguiente, un aspecto de la invención comprende una construcción de ácido nucleico que comprende

- (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica una pro-región;  
(ii) una secuencia de ácido nucleico de una proteína portadora, o un fragmento o variante de la misma; y  
(iii) un sitio de restricción adyacente a la secuencia de ácido nucleico de la proteína portadora o un fragmento o variante de la misma, en la que una secuencia del gen de toxina de artrópodo, o una secuencia de un fragmento o variante biológicamente activo de la misma puede ser insertada dentro del marco, conservando la variante al menos un 50 % de la actividad biológica de la toxina de artrópodo y teniendo una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 75 % de identidad con la secuencia de la toxina de artrópodo; en la que la pro-región de artrópodo es una secuencia entre una secuencia de péptido señal y un extremo N-terminal de una proteína madura; y  
en la que la proteína portadora, fragmento o variante de la misma es capaz de mediar en la translocación de la proteína de fusión del intestino de un invertebrado.

La pro-región y la proteína portadora pueden ser cualquier pro-región/proteína portadora analizada en relación con los aspectos mencionados anteriormente de la invención.

Los métodos para preparar construcciones de ácido nucleico utilizan técnicas rutinarias de biología molecular. Se han desarrollado diversos métodos para unir polinucleótidos para formar ADN monocatenario o bicatenario continuo, especialmente bicatenario, por ejemplo, a través de los términos cohesivos de complementariedad producidos por digestión con enzimas de restricción. Los métodos adecuados se describen en Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: 3ª edición. Los expertos en la materia pueden recurrir con facilidad a tales métodos para preparar una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el segundo aspecto de la invención. Además, los ejemplos adjuntos proporcionan detalles adicionales sobre cómo preparar tales moléculas.

Una forma deseable de preparar las construcciones de ácido nucleico de la invención es utilizar la reacción en cadena de la polimerasa. Este método puede utilizarse para introducir ADN en un vector adecuado, por ejemplo, por ingeniería, en sitios adecuados para digestión con enzimas de restricción, o puede utilizarse para modificar el ADN de otra forma útil, tal como se conoce en la técnica.

En una realización de la invención, las construcciones de ácido nucleico de acuerdo con los aspectos mencionados anteriormente de la invención, y realizaciones de los mismos, son construcciones de expresión.

Una "construcción de expresión" es un término bien 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 ácido nucleico 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 esa secuencia de ácido nucleico mediante la transcripción celular y los complejos ribosómicos de la maquinaria de traducción. 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. El objetivo de un vector de expresión es la producción de grandes cantidades de ARN mensajero estable y, por lo tanto, de proteínas.

Las construcciones de ácido nucleico de la invención pueden comprender secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, fragmentos terminadores, secuencias potenciadoras, genes marcadores y/u otras secuencias. Para más detalles, véase, por ejemplo, Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: 3ª edición.

Las construcciones de ácido nucleico pueden ser modificadas por ingeniería para que contengan secuencias reguladoras que actúan como regiones potenciadoras y promotoras, y conducen a una transcripción eficaz de la secuencia de proteína de fusión transportada en la construcción. La mayor parte de las unidades reguladoras están situadas corriente arriba de la secuencia codificante del gen heterólogo y están operativamente unidas a la misma. La construcción de ácido nucleico puede contener además una región sin traducir en dirección 3' corriente abajo que comprende un sitio de poliadenilación, si se prevé la expresión en un hospedador eucariota, por ejemplo, *Pichia pastoris*. Las secuencias reguladoras pueden dirigir una expresión constitutiva o inducible de la secuencia codificante heteróloga.

Los métodos utilizados para unir fragmentos individuales de ácido nucleico con el fin de crear las construcciones de ácido nucleico de la invención, pueden introducir 2-4 residuos de aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal de la pro-región, y hasta 12 aminoácidos en el extremo C-terminal de la proteína portadora. También pueden encontrarse regiones "enlazadoras" cortas entre la toxina y las secuencias portadoras. Estos residuos de aminoácidos adicionales mantienen la secuencia codificante y no afectan a la actividad de las toxinas o proteínas de fusión.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "actividad biológica" se refiere a la toxicidad de la toxina recombinante para plagas de invertebrados. El cálculo de la actividad biológica puede basarse en la DL<sub>50</sub>.

La incorporación de una pro-región en una construcción de ácido nucleico para la expresión de una toxina

recombinante puede dar como resultado, como mínimo, a un aumento del 25 %, 50 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 % o mayor de la actividad biológica, en comparación con la actividad biológica de una toxina recombinante producida a partir de una construcción de ácido nucleico sin una pro-región. En el presente caso, tal actividad biológica puede ser una actividad pesticida, que puede medirse mediante varias técnicas, incluyendo la muerte de las plagas, longevidad reducida, limitación de la reproducción tal como la reducción de la fertilidad o la producción de óvulos y similares.

La incorporación adicional de una secuencia de una proteína portadora, en una construcción de expresión para la expresión de una toxina recombinante puede dar como resultado, como mínimo, un aumento del 25 %, 50 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 % o mayor de la actividad biológica, en comparación con la actividad biológica de una toxina recombinante producida a partir de una construcción de ácido nucleico que contiene la secuencia de toxina y una pro-región.

El sistema de expresión de la presente invención puede ser tanto procariótico como eucariótico. Los sistemas de expresión adecuados incluyen sistemas de expresión bacterianos (por ejemplo, *E. coli* y *Bacillus subtilis*), sistemas de expresión de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*), sistemas de expresión de hongos filamentosos (por ejemplo, *Aspergillus*), y sistemas de expresión celular de plantas, animales e insectos. Sin embargo, resulta preferente que el sistema de expresión utilizado sea la levadura *Pichia pastoris*. Los sistemas de expresión de proteína de *Pichia* son bien conocidos en la técnica, y en consecuencia, las células para su uso como células hospedadoras pueden ser fácilmente obtenidas.

La célula hospedadora puede ser procariota o eucariota. Las células hospedadoras procariotas preferidas son normalmente cepas de *E. coli* tales como, por ejemplo, las cepas de *E. coli* DH5 y RR1. Las células hospedadoras eucariotas preferentes incluyen células de levadura, insecto y mamífero, preferentemente células de vertebrados, tales como, por ejemplo de ratón, rata, mono o estirpes celulares fibroblásticas humanas. Las células hospedadoras de levadura incluyen YPH499, YPH500 y YPH501 que están disponibles generalmente en Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE. UU. Sin embargo, resulta preferente que la célula hospedadora sea la levadura *Pichia pastoris*. Los sistemas de expresión de proteína de *Pichia* son bien conocidos en la técnica, y por ende, las células para su uso como células hospedadoras pueden ser fácilmente obtenidas. Resulta especialmente preferente cuando la cepa celular es SMD1168H, que se puede obtener en Invitrogen™.

La transformación de las células hospedadoras apropiadas con una construcción de ácido nucleico 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 procariotas, véase, por ejemplo, Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: 3ª edición. La transformación de células de levadura se describe en Sherman *et al.*, 1986.

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 y Guarente, 1990.

Las células transformadas con éxito, es decir, las células que contienen una construcción de ácido nucleico de acuerdo con 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 ácido nucleico de la presente invención para producir una proteína de fusión de toxina. Se pueden recoger y lisar las células y examinar su contenido de ADN para la presencia del ADN tal como lo descrito por Southern, 1975 o Berent *et al.*, 1985.

Por tanto, además de las propias células hospedadores transformadas, la presente invención también contempla un cultivo de dichas células, preferentemente, un cultivo monoclonal, o un cultivo derivado de un cultivo monoclonal, en un medio nutriente.

Una realización de los aspectos mencionados anteriormente de la invención es aquella en la que la construcción de ácido nucleico comprende además una secuencia que codifica una etiqueta de afinidad para ayudar en la recuperación y purificación de la proteína de toxina, una vez expresada.

El uso de secuencias de etiqueta de aminoácidos cortas para ayudar en la purificación de afinidad de proteínas recombinantes es muy conocido en la técnica. De hecho, muchas construcciones de expresión de proteína disponibles comercialmente incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican tales 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. En la técnica se conoce varias etiquetas de afinidad diferentes, incluyendo la proteína de unión a quitina (CBP), proteína de unión a maltosa (MBP), glutatión-S-transferasa (GST), y la etiqueta polihistidina (etiqueta His).

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

etiqueta de afinidad adicional codifica una etiqueta His.

5 El método para producir la toxina recombinante puede comprender además el cultivo de la célula hospedadora tal y como se describe en el presente documento (durante un tiempo suficiente y en condiciones apropiadas en un medio de cultivo de manera que se obtenga la expresión de la proteína de fusión.

10 Los métodos para cultivar células hospedadoras y aislar proteínas recombinantes se conocen bien en la técnica. Ejemplos de técnicas de purificación adecuadas se describen en los ejemplos adjuntos. Como se ha descrito anteriormente, la proteína de fusión puede comprender una etiqueta de afinidad de manera que ayude en la purificación utilizando reactivos de afinidad, tal como conocerán los expertos en la materia.

15 La proteína de toxina recombinante con actividad biológica aumentada de acuerdo con la presente invención se puede recuperar y purificar a partir de cultivos de células recombinantes a través de métodos bien conocidos entre los que se incluyen precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía con hidroxapatita y cromatografía con lectina.

20 Alternativamente, la proteína de toxina recombinante con actividad biológica aumentada de acuerdo con la presente invención puede ser recuperada del sobrenadante. En este caso, se retira la célula hospedadora del sobrenadante por simple centrifugación, como podrá apreciar un experto en la materia. La proteína se puede aislar del medio de cultivo utilizando técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como las técnicas mencionadas anteriormente.

25 Los inventores han determinado que la proteína de toxina recombinante con actividad biológica aumentada de acuerdo con la presente invención puede ser utilizada como pesticida.

30 Un aspecto adicional de la invención proporciona una composición pesticida que comprende una proteína de toxina producida de acuerdo con el primer aspecto de la invención y cualquier realización del mismo descritos en la presente memoria descriptiva.

35 Un pesticida puede ser una sustancia química, agente biológico (tal como un virus o una bacteria), antimicrobiano, desinfectante o dispositivo utilizado contra cualquier plaga. Las plagas incluyen insectos, patógenos de plantas, malezas, moluscos, aves, mamíferos, peces, nematodos (ascárides), y microbios que destruyen terrenos, propagan enfermedades o son un vector de enfermedades o causan una molestia. Sin embargo, para la presente invención, por "pesticida" se entiende que la plaga es cualquier animal invertebrado que destruye terrenos, particularmente los productos básicos agrícolas.

40 Más preferentemente aún, la proteína de toxina es capaz de destruir, o al menos debilitar, plagas de insectos de los siguientes órdenes: coleópteros, p. ej., gusano sureño de la raíz del maíz (*Diabrotica undecimpunctata*); gorgojo de cuatro manchas (*Callosobruchus maculatus*); lepidópteros, p. ej., barrenador europeo del maíz (*Ostinia nubilalis*); gusano del tabaco (*Manduca sexta*); barrenador del tallo (*Chilopartellus*); plagas de homópteros p. ej., saltamontes marrón 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*); áfido del guisante (*Acyrtosiphon pisum*); dípteros, p. ej., mosca amarilla de las cañas *Chlorop pumilionis*; ortópteros, p. ej., grillos y langostas; 45 isópteros, p. ej., termitas; tisanópteros, p. ej., trips; himenópteros, p. ej., plagas de hormigas y artrópodos del orden de los Acarina (ácaros).

50 Las plagas particularmente preferidas incluyen el lepidóptero *Mamestra brassicae*, escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*, un coleóptero), mosca gris del trigo (*Delia coarctata*, un antómiido) y el áfido del cereal *Sitobion avenae*, un homóptero.

55 Los inventores también han investigado si las proteínas de toxinas recombinantes con actividad biológica aumentada producidas de acuerdo con los métodos de la presente invención tienen actividad pesticida contra moluscos. Tal y como se demuestra en los ejemplos adjuntos, han observado de manera sorprendente que la babosa agreste (*Decoceras reticulatum*, un molusco) es susceptible a la actividad pesticida de una proteína de toxina recombinante producida de acuerdo con la presente invención. Por consiguiente, una proteína de toxina recombinante de acuerdo con la presente invención es capaz de destruir, o al menos debilitar, moluscos, incluyendo babosas y caracoles, y particularmente, babosas agrestes.

60 Preferentemente, la composición pesticida de acuerdo con la invención se encuentra en forma de cualquier formulación deseada, tal como una solución, emulsión, pulverización, suspensión, polvo, espuma, pasta, gránulo, aerosol, cápsula u otro material finamente o gruesamente dividido o agente de impregnación para un material natural o sintético.

65 En una realización preferida, la composición pesticida se encuentra en forma de pulverización, suspensión o similares, mezclado con diluyentes, adyuvantes, conservantes, dispersantes, disolventes, agentes emulsionantes o

similares adecuados. Los componentes de composición adecuados son aquellos empleados convencionalmente en la técnica y, en particular, son adecuados para la presente aplicación de administración oral. La composición puede obtenerse con el uso de cualquier disolvente adecuado, preferentemente agua, alcohol, aceite mineral o similares, cualquier vehículo sólido adecuado, tal como caolín, arcilla, talco, creta, cuarzo, atapulgita, montmorillonita, tierra de diatomeas, sílice, o similares, con el uso de cualquier vehículo sólido como soporte para gránulos, tales como calcita, mármol, piedra pómez y material de fibra natural triturado o similares.

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

La composición es adecuada preferentemente para su asociación física o química con plantas y sus locus de crecimiento y para que sea absorbida oralmente por patógenos.

La composición puede comprender por lo tanto una proteína de fusión (toxina) en una cantidad de entre 0,001 % y 99 % en peso, preferentemente entre 0,5 % y 98 % en peso, más preferentemente entre 1,0 % y 95 % en peso.

El término "locus", tal como se ha utilizado anteriormente, se refiere a la localización física en la que crece el cultivo o la planta. Por ejemplo, para cultivos agrícolas, el locus puede ser un campo; para cultivos de verduras, el locus puede ser un macizo o una huerta; y para plantas ornamentales, el locus puede ser una maceta o un recipiente para flores.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona un proceso para la preparación de una composición pesticida de acuerdo con la composición pesticida descrita en el presente documento que comprende la mezcla de una cantidad de proteína de toxina con actividad biológica aumentada producida de acuerdo con la presente invención (y cualquier realización del mismo descrito en esta memoria descriptiva) con uno o más vehículos, diluyentes, adyuvantes, conservantes, dispersantes, disolventes, agentes emulsionantes adecuados en una cantidad pesticida eficaz.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para evitar o tratar una infección de una planta por plagas que comprende la aplicación de una cantidad de la proteína de toxina con una actividad biológica aumentada producida de acuerdo con la presente invención o una composición pesticida de acuerdo con la presente invención a la planta o a su locus de crecimiento; o la introducción a la planta de la construcción de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

Se puede controlar una serie de diferentes plagas de moluscos utilizando el método del aspecto anterior de la invención, particularmente la babosa agreste (*Decoceras reticulatum*). Por consiguiente, el método incluye cuándo el molusco es una babosa o un caracol, y particularmente una babosa agreste.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona un método para evitar o tratar una infección por plagas de moluscos de una planta que comprende la aplicación de una cantidad de la proteína de toxina con una actividad biológica aumentada producida de acuerdo con la presente invención, o una composición pesticida de acuerdo con la invención a la planta o a su locus de crecimiento; o la introducción a la planta de una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

La proteína de toxina con actividad biológica aumentada producida de acuerdo con la presente invención y los aspectos relacionados y las realizaciones de la invención enumerados anteriormente, en particular las composiciones pesticidas, pueden utilizarse como molusquicidas.

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 gránulos que se pueden aplicar también sobre los cultivos y/o locus.

En la técnica se sabe que el molusquicida se presenta habitualmente en forma de cebo (o en microgránulos). Cuando se presenta en tal formato, el usuario puede aplicar fácilmente el molusquicida a la planta o a su locus de crecimiento y evitar o tratar así la infección por plagas de moluscos.

Un aspecto adicional de la invención proporciona por lo tanto una composición de cebo molusquicida que comprende una proteína de toxina con actividad biológica aumentada producida de acuerdo con la presente invención y/o una composición pesticida de acuerdo con la presente invención.

Los microgránulos o cebo también pueden incluir un atrayente para el molusco para animar 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. Los fagoestimulantes para molusquicidas adecuados incluyen cereales molidos (tales como harina de trigo, harina de cebada, harina de centeno y almidón de arroz), alubias de soja trituradas, harina de pescado, melaza, 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 también puede comprender uno o más repelentes para pájaros, tales como antraquinona.

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

Otros auxiliares que se pueden utilizar en el cebo o la composición de microgránulos de la presente invención incluyen, por ejemplo, aglutinantes (como metilcelosolve, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, poliácridatos, polimetacrilatos, ceras naturales, ceras químicamente modificadas y ceras sintéticas, azúcares, almidón, alginatos, agar, lignosulfonatos y goma arábiga), humectantes (tales como polialcoholes, por ejemplo, azúcares y glicerol), conservantes, colorantes y repelentes para especies de sangre caliente.

La composición de cebo también puede recubrirse para protegerla contra la degradación por la humedad. Tal recubrimiento puede extender la vida de la composición de cebo y reducir la frecuencia de reaplicación necesaria. Convenientemente, la composición de cebo no se degrada prematuramente cuando se aplica en suelo húmedo.

La composición de cebo se proporciona normalmente en forma de gránulos o microgránulos. El tamaño de los microgránulos es tal que pueden asegurar que los gasterópodos diana los ingieran. Normalmente, los microgránulos tienen una longitud de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 5 mm.

Otro aspecto de la invención proporciona una planta transgénica o progenie de la misma que comprende una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención capaz de expresar una toxina de acuerdo con la presente invención.

Por "planta transgénica" se incluye que la planta puede tener una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención incorporada a su línea germinal o que la planta puede contener una construcción de ácido nucleico exógeno de acuerdo con la presente invención, cualquiera de las cuales puede ser expresado en la planta.

Se apreciará que una planta transgénica que contiene una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la invención, cuando se regula de manera correcta, producirá una proteína de toxina con actividad biológica aumentada de acuerdo con un método de la invención. La proteína/proteína de fusión producida funcionará como un pesticida.

Una serie de diferentes especies de plantas pueden ser modificadas para incluir la construcción de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

Un experto en la materia sabrá que se puede utilizar cualquier planta monocotiledónea o dicotiledónea. Una planta dicotiledónea se puede seleccionar entre familias que incluyen, pero sin limitarse a, Asteráceas, Brasicáceas (p. ej., *Brassica napus*), Quenopodáceas, Cucurbitáceas, Legumináceas (Cesalpiniáceas, Esalpiniáceas, Mimosáceas, Papilionáceas o Fabáceas), Malváceas, Rosacáceas o Solanáceas. Por ejemplo, se puede seleccionar la planta entre lechuga, girasol, *Arabidopsis*, brócoli, espinaca, sandía, calabacín, repollo, tomate, patata, pimiento, tabaco, algodón, oca, manzana, rosa, fresa, alfalfa, judía, soja, haba común (haba), guisante, lenteja, cacahuete, garbanzo, albaricoques, peras, melocotón, uva o cítricos.

Se incluyen también cultivos para biocombustible o bioenergía, tales como caña de azúcar, semilla de aceite de colza/canola, linaza, sauce, chopo, híbridos de chopo, pasto varilla, Miscanto o gimnospermas, tales como pino de incienso. Se incluyen también cultivos para ensilaje (p. ej., maíz forraje, pasto o forraje, (p. ej., gramíneas, trébol, esparceta, alfalfa), fibras (p. ej., algodón, lino), materiales para construcción (p. ej., pino, roble), pulpación (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, por ejemplo, puede seleccionarse entre las familias de las Arecáceas, Amarillidáceas o Poacáceas. Por ejemplo, la planta puede ser un cultivo de cereal, tal como trigo, arroz, cebada, maíz, avena, sorgo, centeno, cebolla, puerro, mijo, trigo sarraceno, hierba de césped, raigrás italiano, pasto varilla, Miscanto, caña de azúcar o especies *Festuca*.

Preferentemente, la planta es una planta de cultivo. Por planta de cultivo se entiende cualquier planta que se cultiva a escala comercial para el consumo humano o animal o para su uso u otro uso distinto a alimento/pienso. Las plantas preferidas son maíz, tabaco, trigo, arroz, aceite de semilla de colza, sorgo, soja, patata, tomate, cebada, guisante, judía, haba común, algodón, lechuga, brócoli u otras verduras del género *Brassica*.

La construcción de ácido nucleico puede ser introducida como un transgén 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 bien conocidas en la técnica. También es bien conocido el uso de técnicas específicas para cada una de las especies vegetales enumeradas en el presente documento. Los expertos en la materia pueden adoptar los métodos de la técnica fácilmente para preparar una planta transgénica o progenie de la misma que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

Cuando se utiliza para preparar una planta transgénica de este aspecto de la invención, la construcción de ácido nucleico está colocada normalmente dentro de un "casete de expresión" adecuado para ordenar la expresión de la secuencia de ácido nucleico en la planta. El casete de expresión contendrá normalmente una secuencia de ácido nucleico 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 bien conocidos.

Se pueden utilizar otros promotores para regular la expresión específica de órgano o tejido en la construcción de ácido nucleico. 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 (tales como hojas o semillas), tejidos específicos (tales como embrión o cotiledón) o tipos de células específicas (tales como parénquima de las hojas o células de almacenamiento de semillas). 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. Los promotores adecuados incluyen el promotor de napingen de semilla de colza, el 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, tales como hojas y tallos, incluyen promotores de ribulosa -1,5-bisfosfato carboxilasa (RbcS), tales como el promotor de RbcS de alerce oriental (*Larix laricina*), el promotor del pino cab6, el 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 para el simportador de sacarosa H<sup>+</sup> SUC2 de *Arabidopsis thaliana*. Los expertos en la materia pueden identificar fácilmente las secuencias de ácido nucleico representativas de dichos promotores, por ejemplo, de GenBank.

Los promotores adecuados para la expresión preferente en tejidos de la raíz de la planta incluyen, por ejemplo, el promotor derivado del gen 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).

Los promotores inducibles incluyen promotores que son responsables de estímulos del entorno abióticos y bióticos. Los estímulos del entorno abióticos incluyen disponibilidad de luz, temperatura y agua. Los estímulos del entorno bióticos 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, citocininas, auxinas, giberelinas, etileno, brasiconosteroides y péptidos tales 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 que se produzca la expresión génica en un momento específico. Los ejemplos de tales promotores son promotor inducible por ácido salicílico, promotor inducible por tetraciclina, y promotor inducible por etanol (documento (WO 93/21334).

Con el fin de obtener una mejora de la expresión en plantas, se puede modificar el uso de codón de la construcción de ácido nucleico 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 toxina en células vegetales. Además, se puede 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 obtener una mejora de la expresión en plantas monocotiledóneas tales como maíz o arroz, se puede añadir también un intrón (p. ej., un intrón monocotiledóneo) a un gen quimérico.

Resulta preferente que los ácidos nucleicos quiméricos de la invención (y adecuados para su uso en los métodos de la invención) comprendan además secuencias de ácidos nucleicos para la expresión de productos que pueden ayudar en la identificación de células vegetales en las que se han incorporado con éxito secuencias de ácidos nucleicos quiméricos. Para los expertos en la materia resultarán evidentes ejemplos de secuencias de ácido nucleico

adicionales adecuadas 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 (tales como antibióticos) o marcadores que dan lugar a un producto detectable que se puede utilizar como base para la selección (tales como producto de enzima cromogénica).

5 Un aspecto adicional de la presente invención proporciona una planta transformada con una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

10 También se describe una semilla vegetal que comprende una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

15 Un aspecto relacionado de la invención proporciona el uso de una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención o una proteína de toxina producida de acuerdo con la presente invención en la fabricación de un pesticida o una célula vegetal o planta transgénica.

Un aspecto relacionado de la invención proporciona el uso de un pesticida para destruir o debilitar una o más plagas.

### Descripción detallada

20 La presente invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos y figuras no limitantes, que muestran:

#### Figura 1: Esquema de la estructura génica de las toxinas que contienen pro-regiones

25 (A) Esquema de la estructura génica de las proteínas de toxinas que contienen pro-regiones. (B) Secuencia de la toxina de araña, Hv1a. La secuencia de aminoácidos en caja corresponde a la pro-región.

#### Figura 2: Expresión y purificación de la toxina recombinante Hv1a y pro-Hv1a

30 (A) Análisis en gel SDS-PAGE (20 % de acrilamida) que muestra la purificación de una toxina recombinante Hv1a marcada con Strep del sobrenadante de cultivo. Los carriles 1 y 2 son niveles de GNA (0,5 y 0,25 µg, respectivamente) y los carriles 3 y 4 son fracciones de pico (10 µl) tras la elución de la columna de estreptactina con destiotobiotina 2,5 mM. (B) Análisis en gel Tris-tricina (15 % de acrilamida) de pro-Hv1a recombinante, los carriles 1 y 2 son fracciones de pico (10 µl) tras la elución de una columna de afinidad de níquel con imidazol 0,2 M. La flecha representa el principal producto proteico que se predice que es pro-Hv1a, del cual se ha escindido la etiqueta de histidina. (C) Análisis de membrana Western de la muestra en (B) utilizando anticuerpos anti-His.

#### Figura 3: Análisis en gel SDS-PAGE de muestras liofilizadas de pro-Hv1a/GNA, Hv1a/GNA y MODHv1a/GNA purificadas

40 Análisis en SDS-PAGE (17,5 % de gel de acrilamida) de Hv1a recombinante purificada que contiene una proteína de fusión, teñida con gel para las proteínas totales con azul de Coomassie. Cargado de la siguiente manera: carril 1: pro-Hv1a/GNA; carril 2: Hv1a/GNA; carril 3: MODHv1a/GNA; carriles 4-6: niveles de GNA de 1, 2 y 4 µg, respectivamente; carriles 7-9: 12,5, 25 y 50 µg de pro-Hv1a/GNA liofilizada y purificada (para permitir la cuantificación del contenido de la proteína de fusión).

#### Figura 4: Toxicidad de inyección de pro-Hv1a, pro-Hv1a/GNA y Hv1a/GNA recombinante en *Mamestra brassicae*

45 Porcentaje de supervivencia de larvas de *Mamestra brassicae* en 3<sup>er</sup>-5<sup>o</sup> estado larvario tras la inyección de diferentes dosis de pro-Hv1 a, pro-Hv1a/GNA o Hv1 a/GNA recombinante. (A) Porcentaje de supervivencia de larvas en 5<sup>o</sup> estado larvario tras la inyección de varias dosis de pro-Hva1. (B) Porcentaje de supervivencia de larvas en 3<sup>er</sup>-4<sup>o</sup> estado larvario tras la inyección de varias dosis de pro-Hv1a/GNA (Dosis A) o Hv1a/GNA (Dosis B). (C) Porcentaje de supervivencia de larvas en 5<sup>o</sup> estado larvario tras la inyección de varias dosis de pro-Hv1a/GNA (Dosis A) o Hv1a/GNA (Dosis B).

#### Figura 5: Toxicidad de ingestión de pro-Hv1a, Hv1a/GNA, pro-Hv1a/GNA y GNA recombinante en *Mamestra brassicae*

55 Porcentaje de supervivencia de larvas de *Mamestra brassicae* en 3<sup>er</sup> estado larvario tras la ingestión de una sola gota de 2 µl que contiene 20 µg de pro-Hv1 a, Hv1 a/GNA, pro-Hv1a/GNA o GNA purificada. Las larvas de control fueron alimentadas con una gota que no contenía ninguna proteína añadida (n=10 por tratamiento).

#### Figura 6: Toxicidad de ingestión de pro-Hv1a, pro-Hv1a/GNA, Hv1a/GNA o GNA recombinante en *Acyrtosiphon pisum* y *Sitobion avenae*

60 Porcentaje de supervivencia de (A) *Acyrtosiphon pisum* (áfidos del guisante) y (B) *Sitobion avenae* (áfidos del cereal) con dietas artificiales que contienen 0,05-0,75 mg/ml de pro-Hv1a, pro-Hv1a/GNA, Hv1a/GNA o GNA recombinante purificada.

#### Figura 7: Toxicidad de inyección de pro-Hv1a/GNA y Hv1a/GNA recombinante en *Deroceras reticulatum*

65 Porcentaje de supervivencia de *Deroceras reticulatum* (200 mg ± 40 mg) a los que se les inyectó 100, 50 o 25 µg

de Hv1a/GNA o pro-Hv1a/GNA. n=18 para el tratamiento de control; n=10 para una dosis de 100 µg; y n=8 para una dosis de 50 y 25 µg.

**Figura 8: Expresión y purificación de la toxina recombinante PI1a y Ao1bPro-PI1a**

(A) Toxina PI1a derivada de una construcción que codifica la secuencia de toxina madura separada en SDS-PAGE "normal"; M indica marcador, las cargas de PI1a son de 5 y 10 µg. (B) Toxina PI1a (5 µg) separada en SDS-PAGE después de la desnaturalización por urea 6 M. (C) Toxina PI1a recombinante derivada de una construcción que contiene la pro-región designada Ao1b en SDS-PAGE, las cargas de Ao1bPro-PI1a son de 2,5 µg. (D) Inmunoelctrotransferencia de Ao1bPro-PI1a purificada (25, 50 y 100 ng) utilizando anticuerpos anti-His.

**Figura 9: Caracterización de las proteínas de fusión PI1a/GNA recombinantes purificadas por SDS-PAGE**

(A) Análisis por SDS-PAGE de la proteína de fusión PI1a/GNA (10 µg) y nivel de GNA (5 µg). (B) Desglucosilación de la proteína de fusión PI1a/GNA utilizando PNGasa F (banda indicada por la punta de flecha abierta), nivel de GNA (5 µg). (C) Análisis por SDS-PAGE de Ao1bPro-PI1a/GNA (1, 2 y 4 µg), nivel de GNA (5 µg). (D) Análisis por SDS-PAGE de Hv1aPro-PI1a/GNA (1, 2 y 4 µg), niveles de GNA (1, 2 y 4 µg).

**Figura 10: Toxicidad de inyección de PI1a y Ao1bPro-PI1a recombinantes en *Mamestra brassicae***

(A) Porcentaje de supervivencia de larvas de *Mamestra brassicae* en 5º estado larvario tras la inyección de diferentes dosis de PI1a recombinante purificada. (B) Porcentaje de supervivencia de larvas de *Mamestra brassicae* en 5º estado larvario tras la inyección de diferentes dosis de PI1a recombinante purificada (Dosis A) o Ao1bPro-PI1a (Dosis B).

**Figura 11: Toxicidad de inyección de PI1a/GNA, Ao1bPro-PI1a/GNA y Pro-HV1a-PI1a/GNA recombinantes en *Mamestra brassicae***

Porcentaje de supervivencia de larvas de *Mamestra brassicae* en 5º estado larvario tras la inyección de diferentes dosis de PI1a/GNA (A), Ao1b-ProPI1a/GNA (B) o Pro-Hv1a-PI1a/GNA (C) recombinante purificada. n=20 por tratamiento.

**Figura 12: Toxicidad de ingestión de PI1a/GNA, Ao1bPro-PI1a/GNA y Hv1aPro-PI1a/GNA recombinantes en *Mamestra brassicae***

Porcentaje de supervivencia de larvas de *Mamestra brassicae* en 3º estado larvario tras la ingestión de una sola gota de 2 µl que contiene 20 µg de proteínas de fusión PI1a/GNA (A), Ao1bPro-PI1a/GNA (B) o Hv1aPro-PI1a/GNA (C) purificadas. Los controles en todos los casos fueron de sacarosa solamente (sin proteína añadida); 30 µg de toxina PI1a (forma madura o modificada) o GNA.

**Abreviaturas**

TU: Tampón de unión  
 QLM: Quimiluminiscencia mejorada  
 PRP: Peroxidasa de rábano picante  
 PBS: Solución salina tamponada con fosfato  
 SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico  
 LPG: Extracto de levadura-peptona-glicerol

**Materiales y métodos**

**Clonación de una proteína de fusión recombinante Hv1a, pro-Hv1a y pro-Hv1a/GNA**

Se ensambló un gen sintético que codifica la secuencia de aminoácidos de Hv1a madura mediante el uso de una serie de oligonucleótidos superpuestos, con el uso de codón optimizado para su expresión en la levadura (Fitches *et al.*, 2012). Para crear una construcción de expresión que codifica el péptido de Hv1a maduro, la secuencia codificante se amplificó mediante PCR utilizando cebadores con sitios *Pst*I y *Sal*I y se purificó a partir de rebanadas de gel escindidas utilizando un kit de extracción de gel QiaQuick (Qiagen), como se describe en el protocolo del fabricante. El fragmento de ADN extraído fue digerido (*Pst*I y *Sal*I) y ligado en un vector de expresión de levadura digerido de manera similar, pGAPZaB (Invitrogen) que había sido modificado previamente para contener una etiqueta de Strep en 5' en el marco con la secuencia pre-pro del factor α de levadura. El plásmido resultante se transformó en células electrocompetentes de *E. coli* y los clones seleccionados se comprobaron para el correcto ensamblaje de la construcción mediante electroforesis en gel y secuenciación de ADN.

La secuencia codificante pro-Hv1 a fue amplificada por PCR utilizando cebadores con sitios *Pst*I y *Xba*I (Directo: TACT-GCAGCAGAAGATACTAGAGCT e Inverso: ATTCTAGAATCACATCTCTTAAC). Los productos extraídos por gel fueron digeridos con *Pst*I y *Xba*I y ligados en un vector de expresión de levadura digerido de manera similar, pGAPZaB. El plásmido recombinante resultante se transformó en células de *E. coli* y los clones seleccionados se comprobaron para el correcto ensamblaje de la construcción mediante electroforesis en gel y secuenciación de ADN.

Para producir la construcción pro-Hv1a/GNA, la secuencia codificante pro-Hv1 a fue amplificada por PCR utilizando

cebadores con sitios *Pst*I y *Not*I (Directo: TACTGCAGCAGAAGATACTAGAGCT e Inverso: ATGCGGCCGC ATCACATCTCTTAAC) y purificada por electroforesis en gel como se ha descrito anteriormente. Después de la restricción por *Pst*I y *Not*I, el producto de la PCR se ligó a un plásmido pGAPZaB previamente generado que contenía la secuencia codificante de GNA madura digerida con las mismas enzimas. Los clones seleccionados que

5 contenían el vector de expresión que codificaba la proteína de fusión pro-Hv1a/GNA se verificaron mediante la secuenciación del ADN.

Las secuencias de las construcciones de Hv1 a se muestran a continuación:

10 *Hv1a nativa*: SPTCIPSGQPCPYNENCCSQSCTFKENENGNTVKRCD

*Hv1a recombinante (secuencia señal del factor alfa, toxina de Hv1a, Región resaltada en verde de la etiqueta Strep, sin pro-región, sin vehículo)*:

15 MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNST  
NGLLFINTTASIAAAKEEGVSLEKREAEAAWHPQFEKGLQSPTCIPSGQPCPYNEN  
CCSQSCTFKENENGNTVKRCD

20 *pro-Hv1a recombinante (secuencia señal del factor alfa, toxina de Hv1a, pro-región, sin vehículo, etiqueta (His)<sub>6</sub>)*:

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNST  
NGLLFINTTASIAAAKEEGVSLEKREAEAAAEDTRADLQGGEEAEKVFRRSPTCIPSG  
QPCPYNENCCSQSCTFKENENGNTVKRCDALEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH

25 *Hv1a/GNA recombinante (secuencia señal del factor alfa, toxina de Hv1a, sin pro-región, vehículo)*:

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNST  
NGLLFINTTASIAAAKEEGVSLEKREAEAAAASPTCIPSGQPCPYNENCCSQSCTFKEN  
ENGNTVKRCDAAADNILYSGETLSTGEFLNYGSFVIMQEDCNLVLYDVKPIWATNT  
30 GGLSRSCFLSMQTDGNLVVYNPSNKPIWASNTGGQNGNYVCILQKDRNVVIYGTDR  
WATGVD

*pro-Hv1a/GNA recombinante (secuencia señal del factor alfa, toxina de Hv1a, pro-región, vehículo, etiqueta (His)<sub>6</sub>)*:

35 MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNST  
NGLLFINTTASIAAAKEEGVSLEKREAEAAAEDTRADLQGGEEAEKVFRRSPTCIPSG  
QPCPYNENCCSQSCTFKENENGNTVKRCDAAADNILYSGETLSTGEFLNYGSFVIM  
QEDCNLVLYDVKPIWATNTGGLSRSCFLSMQTDGNLVVYNPSNKPIWASNTGGQN  
40 GNYVCILQKDRNVVIYGTDRWATGVDHHHHHH

#### Clonación de las proteínas de fusión PI1a y PI1a/GNA recombinantes

45 Un ADN bicatenario que incorpora una secuencia que codifica la toxina PI1a madura (P83256), con uso de codón optimizado para la levadura, fue diseñado por los inventores y sintetizado y suministrado por ShineGene Molecular Biotech, Inc. (Shanghai 201109, China; <http://www.synthesisgene.com/>) en el vector pUC57. Otros oligonucleótidos fueron suministrados por Sigma Chemical Co.

50 La secuencia codificante PI1a fue transferida de pUC57 al vector de expresión de levadura pGAPZaB (Invitrogen) mediante la digestión con *Pst*I y *Xba*I, aislamiento del fragmento de la secuencia codificante por electroforesis en gel de agarosa, seguido de una ligadura a pGAPZaB que había sido digerido con las mismas enzimas. Los fragmentos de ADN fueron purificados de las rebanadas de gel escindidas utilizando un kit de extracción de gel QiaQuick (Qiagen). El plásmido recombinante resultante fue clonado utilizando protocolos convencionales por transformación de células electrocompetentes de *E. coli*. Los clones seleccionados se comprobaron para el correcto ensamblaje de

55 la construcción mediante la secuenciación del ADN. Para producir la construcción modificada para la expresión de PI1a, se ensamblaron dos oligonucleótidos sintéticos complementarios que codificaban la pro-región de U3-agatoxina-Ao1b (Q5Y4V7) y se insertaron en el sitio *Pst*I de la construcción de expresión PI 1a. El correcto ensamblaje de la construcción (ProAo1b-PI 1a) fue comprobado por la secuenciación de ADN.

60 Para producir una construcción que codifica la proteína de fusión PI1a/GNA, la secuencia codificante PI1a madura de una construcción de expresión verificada en pGAPZaB fue escindida por digestión con *Pst*I y *Not*I y purificada por electroforesis en gel de agarosa. Un plásmido pGAPZaB que contenía la construcción de la proteína de fusión Hv1 a/GNA (Fitches *et al.*, 2012) fue digerido con *Pst*I y *Not*I para eliminar la secuencia codificante Hv1a y purificada por electroforesis en gel de agarosa. La región codificante Hv1a fue posteriormente reemplazada con PI1a al ligar los

65 fragmentos purificados y clonar el plásmido recombinante resultante. Para producir la construcción de expresión modificada para PI1a/GNA que contiene la pro-región de U3-agatoxina-Ao1b, la construcción de expresión

PI1a/GNA se modificó como se ha descrito anteriormente; asimismo, también se utilizó una pro-región de la toxina pro-Hv1a en una construcción adicional designada como Pro-Hv1a-PI 1a. Los clones seleccionados que contenían el vector de expresión que codificaba las proteínas de fusión pro-Hv1a/GNA se verificaron mediante la secuenciación de ADN. Toda la secuenciación del ADN se llevó a cabo utilizando secuenciadores automatizados de ADN ABI Prism 3730 Applied Biosystems de DBS Genomics, Escuela de Ciencias Biológicas y Biomédicas, Universidad de Durham, Reino Unido.

Las secuencias de las construcciones de PI1 a se muestran a continuación:

10 *PI1a nativa*: GCLGEGEKCADWSGSPCCDGFYCSRSMPYCRNRNS

*PI1a recombinante (secuencia señal del factor alfa, toxina de PI1a, sin pro-región, sin vehículo, etiqueta (His)<sub>6</sub>):*

15 MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNST  
 NNGLLFINTTASIAAAKEEGVSLEKREAEAAAAGCLGEGEKCADWSGSPCCDGFYCSRS  
 SMPYCRNRNSALEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH

*Ao1bPro-PI1a recombinante (secuencia señal del factor alfa, pro-región [Ao1b], toxina de PI1a, sin vehículo, + etiqueta (His)<sub>6</sub>):*

20 MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNST  
 NNGLLFINTTASIAAAKEEGVSLEKREAEAAAISYEEGKELFQKERGCLGEGEKCADWS  
 GPCCDGYCSRSMPYCRNRNSALEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH

25 *PI1a/GNA recombinante (secuencia señal del factor alfa, toxina de PI1a, sin pro-región, vehículo, etiqueta (His)<sub>6</sub>):*

30 MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNST  
 NNGLLFINTTASIAAAKEEGVSLEKREAEAAAAGCLGEGEKCADWSGSPCCDGFYCSRS  
 SMPYCRNRNSAAADNILYSGETLSTGEFLNYGSFVIMQEDCNLVLDVDPKIWATN  
 TGGLSRSCFLSMQTDGNLVVYNPSNKPIWASNTGGQNGNYVCILQKDRNVVIYGTDR  
 WATGVDHHHHHH

*Ao1bPro-PI1a/GNA recombinante (secuencia señal del factor alfa, pro-región [Ao1b], toxina de PI1a, vehículo, etiqueta (His)<sub>6</sub>):*

35 MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNST  
 NNGLLFINTTASIAAAKEEGVSLEKREAEAAAISYEEGKELFQKERGCLGEGEKCADWS  
 GPCCDGCSCRSMPYCRNRNSAAADNILYSGETLSTGEFLNYGSFVIMQEDCNLV  
 LYDVKPIWATNTGGLSRSCFLSMQTDGNLVVYNPSNKPIWASNTGGQNGNYVCILQ  
 40 KDRNVVIYGTDRWATGVDHHHHHH

*Hv1aPro-PI1a/GNA recombinante (secuencia señal del factor alfa, pro-región [Hv1a], toxina de PI1a, vehículo, etiqueta (His)<sub>6</sub>):*

45 MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNST  
 NNGLLFINTTASIAAAKEEGVSLEKREAEAAAEDTRADLQGGEEAEKVFRRGCLGEGE  
 KCADWSGPCCDGFYCSRSMPYCRNRNSAAADNILYSGETLSTGEFLNYGSFVFI  
 MQEDCNLVLDVDPKIWATNTGGLSRSCFLSMQTDGNLVVYNPSNKPIWASNTGGQ  
 50 NGNYVCILQKDRNVVIYGTDRWATGVDHHHHHH

### Expresión de las proteínas de fusión Hv1a, pro-Hv1a, Hv1a/GNA y pro-Hv1a/GNA en levadura

Los plásmidos pGAPZaB que contienen secuencias de Hv1a, pro-Hv1a, Hv1a/GNA y pro-Hv1a/GNA fueron amplificadas en *E. coli*, purificadas y linealizadas con *BlnI* (Takara). Los plásmidos linealizados se transformaron en la cepa SMD1168H de *Pichia pastoris* (Invitrogen) utilizando el kit de transformación EasyComp (Invitrogen) como se describe en el protocolo del fabricante. Los clones de levadura transformados se seleccionaron en placas de agar con LPG (1 % de extracto de levadura (p/v), 2 % de peptona (p/v), 4 % de glicerol (v/v), 1,5 % de agar (p/v)) que contiene zeocina (100 mg/ml). Se comprobó la expresión de los clones seleccionados mediante el análisis de los sobrenadantes de cultivos a partir de cultivos en matraz de agitación a pequeña escala (10 ml) cultivados durante 2-3 días en medios de zeocina y LPG a 30 °C. Las muestras de sobrenadantes se separaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida; los geles fueron transferidos a nitrocelulosa y se probaron con anticuerpos primarios anti-(His)<sub>6</sub> (BioRad) o anticuerpos anti-Strep, o para las membranas de Hv1a/GNA y pro-Hv1a/GNA se probaron con anticuerpos primarios anti-GNA, seguido de un lavado, sondeo con anticuerpos secundarios conjugados con PRP (BioRad), y detección de anticuerpos unidos por QLM, como se ha descrito previamente (Fitches *et al.*, 2001; 2012).

Para la producción de proteínas se seleccionaron clones de *P. pastoris* que contenían la expresión de Hv1a, pro-

Hv1a, Hv1a/GNA y pro-Hv1a/GNA integrada, se cultivaron casetes en un fermentador de sobremesa de 7,5 l BioFlo 110 (New Brunswick Scientific) o en un fermentador de sobremesa de 5 l Bio-Controlly ADI1010 (APPLIKON BIOTECHNOLOGY, Holanda). Se cultivaron cultivos de LPG (200 ml) de *P. pastoris* transformada durante 2-3 días a 30 °C con agitación (sin antibióticos de zeocina) antes de inocular 2,5 l de medio mínimo estéril complementado con sales de PTM1. Se llevó a cabo un cultivo a 30 °C, 30 % de oxígeno disuelto, pH 4,5-5,0 con agitación continua con una alimentación de glicerol en rampa (5-10 ml/h; total 1,25 l) durante un periodo de 4 días. El sobrenadante del cultivo se separó posteriormente de las células por centrifugación (20 min, 8000 rpm; 4 °C), se aclaró por filtración a través de filtros de fibra de vidrio de 2,7 µM y 0,7 µM (GFD y GFF; Whatmann). Para Hv1a solo se ajustó el sobrenadante a tampón fosfato 50 mM que contenía cloruro de sodio 0,3 M a un pH de 8,0, añadiendo 4x soluciones madre concentradas. Hv1a recombinante se purificó en columnas de estreptactina (1 ml) con un caudal de 0,5 ml/min. Las columnas se equilibraron en un tampón fosfato 50 mM que contenía cloruro de sodio 0,3 M a pH 8,0. Hv1a marcada con Strep se eluyó de las columnas utilizando destiobiotina 2,5 mM (en tampón fosfato; pH 8,0). Para todas las demás proteínas, los sobrenadantes se ajustaron a tampón fosfato de sodio 0,02 M, cloruro de sodio 0,4 M, pH 7,4 añadiendo 4x de solución madre concentrada (4X tampón de unión [TU]). Pro-Hv1a Hv1 a/GNA y pro-Hv1a/GNA recombinante fueron purificadas por cromatografía de afinidad de níquel en columnas de níquel para crudos de HisTrap de 5 ml (GE Healthcare) con un caudal de 2 ml/min. Tras la carga, las columnas fueron lavadas con 1x TU (fosfato de sodio 50 mM; cloruro de sodio 0,4 M) y luego con TU que contenía imidazol 0,025 M, y finalmente las proteínas recombinantes unidas se eluyeron con TU que contenía imidazol 0,2 M. En todos los casos, las proteínas eluidas fueron comprobadas en cuanto a su pureza por SDS-PAGE, dializadas contra agua desionizada utilizando múltiples cambios para eliminar todas las moléculas pequeñas, y liofilizadas. Se estimaron las concentraciones de proteínas recombinantes por comparación con cantidades conocidas de niveles de GNA analizados en geles SDS-PAGE o por análisis de BCA utilizando un kit de ensayo de proteínas BCA™ (Thermo Scientific).

## 25 Expresión de proteínas de fusión PI1a y PI1a/GNA en levadura

Los plásmidos pGAPZaB que contenían las construcciones de expresión PI1a y PI1a/GNA fueron amplificados en *E. coli*, purificados y linealizados con *BlnI*. Los plásmidos linealizados se transformaron en la cepa SMD1168H de *Pichia pastoris* (Invitrogen) utilizando el kit de transformación EasyComp (Invitrogen) como se describe en el protocolo del fabricante. Los clones de levadura transformados se cultivaron en placas y se seleccionaron en placas de agar con LPG (1 % de extracto de levadura (p/v), 2 % de peptona (p/v), 4 % de glicerol (v/v), 1,5 % de agar (p/v)) que contiene zeocina (100 mg/ml). Se comprobó la expresión de las proteínas recombinantes de los clones seleccionados (al menos 10 para cada construcción) mediante el análisis del sobrenadante de cultivo a partir de cultivos en matraz de agitación a pequeña escala cultivados durante 2-3 días en medios de zeocina y LPG a 30 °C. Las muestras de sobrenadantes se separaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida; los geles fueron transferidos a nitrocelulosa y se probaron con anticuerpos primarios anti-(His)<sub>6</sub> (BioRad) o anticuerpos primarios anti-GNA, seguido de un lavado, sondeo con anticuerpos secundarios conjugados con PRP (BioRad), y detección de anticuerpos unidos por QLM.

Se cultivaron clones seleccionados de *P. pastoris* que contenían las construcciones de PI1a y PI1a/GNA integradas en un fermentador de sobremesa de 5 l Bio-Controlly ADI1010 (Applikon Biotechnology, Holanda). Para la fermentación, dos cultivos de LPG de 100 ml de *P. pastoris* que contenían toxina o genes de fusión fueron cultivados durante 2-3 días a 30 °C con agitación, antes de utilizarse para inocular 2,5 l de medio mínimo estéril complementado con sales de PTM1. Se continuó con un cultivo a 30 °C, 30 % de oxígeno disuelto, pH 4,5-5,0 con agitación continua con una alimentación de glicerol en rampa (5-10 ml/h) durante un periodo de 4 días. El sobrenadante del cultivo se separó de las células por centrifugación (20 min a 5000 g), y se ajustó a tampón de fosfato de sodio 0,02 M, cloruro de sodio 0,4 M, pH 7,4 añadiendo 5x solución madre concentrada. Las proteínas recombinantes fueron purificadas por cromatografía de afinidad de níquel en columnas de níquel para crudos de HisTrap de 5 ml (GE Healthcare) con un caudal de 2 ml/min. Tras la carga, las columnas fueron lavadas con tampón de fosfato de sodio 0,02 M, cloruro de sodio 0,4 M con un pH de 7,4 y las proteínas unidas se eluyeron con imidazol 0,2 M en el mismo tampón. Las proteínas eluidas fueron comprobadas en cuanto a su pureza por SDS-PAGE, dializadas contra agua desionizada utilizando múltiples cambios para eliminar todas las moléculas pequeñas, y liofilizadas. Se estimaron las concentraciones de proteínas recombinantes por comparación con cantidades conocidas de niveles de GNA analizados en geles SDS-PAGE o por análisis de BCA utilizando un kit de ensayo de proteínas BCA™ (Thermo Scientific).

## Bioensayos en insectos

Las larvas de *Mamestra brassicae* en 3<sup>er</sup>-5<sup>o</sup> estado larvario (aproximadamente 30-55 mg de peso) se utilizaron para bioensayos de inyección. A las larvas se les inyectó diferentes dosis de Hv1a, pro-Hv1a, pro-Hv1a/GNA, PI 1a, A01bProPI1a, PI1a/GNA, A01bPro-PI1a/GNA, o Hv1aPro-PI1a/GNA (n=20 por dosis) en 5 µl de PBS (solución salina tamponada con fosfato; NaCl 0,15 M, tampón de fosfato de sodio 0,015 M, pH 7,2). A las larvas para controles se les inyectó 5 µl 1x PBS. La parálisis y la mortalidad se registraron 12-96 h después de la inyección.

Se llevaron a cabo ensayos de alimentación con gotas para evaluar la actividad oral de Hv1 a/GNA, pro-Hv1 a/GNA, PI 1a, A01bProPI1a, PI1a/GNA, A01bPro-PI1a/GNA, o Hv1aPro-PI1a/GNA con respecto a las larvas de *M. brassicae*

en tercer a quinto estado larvario. Las larvas estuvieron privadas de comida durante aproximadamente 24 h antes de alimentarse con el fin de fomentar el consumo con gotas. Las larvas fueron alimentadas con una gota de 2  $\mu$ l que contenía 20  $\mu$ g de las proteínas de fusión anteriores, 30  $\mu$ g de toxinas o 30  $\mu$ g de GNA, en una solución de 1 x PBS que contenía 10 % de sacarosa (p/p). Las larvas de control fueron alimentadas con gotas de PBS/sacarosa que no contenían ninguna proteína añadida. Las larvas tratadas fueron sometidas a una dieta artificial convencional después del consumo de la gota.

Se ensayaron los efectos insecticidas de Hv1 a/GNA y pro-Hv1a/GNA en *Acyrtosiphon pisum* (áfidos del guisante) y *Sitobion avenae* (áfidos del cereal) al alimentarse con 100  $\mu$ l de dieta artificial líquida que contenía concentraciones conocidas de proteínas de fusión (Prosser y Douglas, 1992), utilizando bolsitas dobles de parafilm (gota de dieta en el medio) para suministrar la dieta a los insectos. En el experimento se utilizaron áfidos de 1-2 días de edad y la supervivencia se evaluó diariamente durante seis días.

#### **Bioensayos de inyección: *Deroceras reticulatum* (molusco, babosa agreste)**

Hv1a/GNA y pro-Hv1a/GNA se sometieron a ensayo para determinar su actividad contra las babosas adultas (*Deroceras reticulatum*) mediante inyección en babosas adultas (0,2-0,3 g). Las babosas se enfriaron a 4 °C (durante aproximadamente 15 minutos) antes de la inyección de 25  $\mu$ g, 50  $\mu$ g o 100  $\mu$ g de proteínas de fusión purificadas resuspendidas en 20  $\mu$ l de PBS. La mortalidad se evaluó diariamente durante 7 días.

#### **Análisis estadístico**

Los datos de supervivencia se analizaron mediante el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier, utilizando el software Prism (v5). Todos los demás análisis de datos se llevaron a cabo utilizando el software de gráficos y análisis de datos de Origin 8.5. El análisis ANOVA (con pruebas post-hoc de Bonferroni-Dunn) se llevó a cabo para determinar cualquier diferencia significativa entre los tratamientos en los parámetros medidos.

#### **Resultados**

Los presentes inventores han realizado experimentos para investigar el efecto de la inclusión de una pro-región en una construcción de expresión para una toxina en la actividad biológica de dicha toxina.

#### **Experimentos que investigan la toxicidad de Hv1a**

##### **Introducción**

Para investigar el efecto de la inclusión de una pro-región en la toxicidad de las toxinas recombinantes, se utilizó  $\omega$ -hexatoxina-Hv1a.  $\omega$ -hexatoxina-Hv1a es una toxina aislada de la araña de tela de embudo *Hadroncyhe versuta*.  $\omega$ -hexatoxina-Hv1a (o  $\omega$ -ACTX-Hv1a) es un antagonista de los canales de calcio y se ha demostrado anteriormente que  $\omega$ -ACTX-Hv1a puede bloquear los canales de calcio de los invertebrados, pero no de los vertebrados.

Aunque se ha demostrado que  $\omega$ -ACTX-Hv1a puede utilizarse de modo independiente como pesticida cuando se aplica tópicamente a las orugas (Khan *et al.*, 2006), no se han notificado más pruebas sobre la actividad insecticida del péptido solo. En la solicitud de patente PCT/GB2012/000287, los presentes inventores demostraron que la toxicidad de una toxina recombinante ( $\omega$ -ACTX-Hv1a) expresada en *Pichia pastoris* podría potenciarse mediante la expresión de la proteína en fusión con la lectina vegetal GNA, que previamente se había demostrado que cruzaba el epitelio intestinal y suministraba péptidos "pasajeros" desde el intestino al sistema circulatorio de los animales invertebrados.

Para investigar más a fondo cómo se podría mejorar la potencia de las toxinas expresadas *in vitro*, los presentes inventores analizaron las secuencias de ADN de los genes que codifican las toxinas de los artrópodos. Las toxinas de artrópodos utilizadas en el documento PCT/GB2012/000287 son pequeñas proteínas ricas en cisteína que pertenecen a varias superfamilias de secuencias de proteínas (que incluyen toxinas procedentes de organismos distintos de los artrópodos). Los genes codificantes incluyen dos secuencias que no están presentes en el producto proteico final; un péptido señal N-terminal previsto que se elimina durante la traducción y una pro-región prevista, entre el péptido señal y la secuencia final de la proteína como aislado (véase la Figura 1A).

Los presentes inventores investigaron el efecto de la inclusión de la pro-región en la construcción de expresión sobre la toxicidad general de la proteína recombinante.

En primer lugar, se utilizó  $\omega$ -ACTX-Hv1a, ya que esta toxina contiene una pro-región prevista en su secuencia génica (véase la Figura 1B).

#### **Construcciones génicas sintéticas, expresión y purificación de Hv1a, pro-Hv1a, Hv1a/GNA y pro-Hv1a/GNA recombinante**

Las construcciones de proteínas de fusión Hv1a, pro-Hv1 a, Hv1 a/GNA y pro-Hv1a/GNA recombinantes se sintetizaron basándose en el vector pGAPZaB, que posee un fuerte promotor constitutivo (*GAPDH*) para dirigir la expresión del gen diana. Los vectores pGAPZ son vectores de integración en la expresión del *huésped Pichia pastoris* y los transformantes seleccionados contienen la construcción de expresión integrada en el genoma hospedador. Las construcciones de expresión de Hv1a y pro-Hv1a recombinante contienen una secuencia de aminoácidos prevista que corresponde a la secuencia publicada para la toxina. Para Hv1a, el péptido maduro fue clonado dentro del marco con la secuencia prepro del factor  $\alpha$  de levadura y 8 aminoácidos que codifican una etiqueta Strep (es decir, WSHPQFEK unida al extremo N-terminal de la secuencia Hv1a madura a través de un enlazador de 3 aminoácidos "GLQ"). Para Pro-Hv1a, la pro-región N-terminal se dispuso dentro del marco del extremo C-terminal en una secuencia que codificaba la secuencia pre-pro del factor  $\alpha$  de levadura, y la construcción también contenía secuencias que codificaban el epítipo myc y la etiqueta (His)<sub>6</sub>, suministrada por el vector, en el extremo C-terminal del producto previsto. Para Hv1a/GNA, la secuencia de toxina madura se fusionó con el extremo N-terminal de una secuencia codificante correspondiente a los residuos 1-105 de lectina de la campanilla de invierno madura (GNA) a través de un péptido enlazador de 3 aminoácidos (AAA). Para pro-Hv1a/GNA, la secuencia codificante pro-Hv1a sintética se fusionó con el extremo N-terminal de una secuencia codificante correspondiente a los residuos 1-105 de lectina de la campanilla de invierno madura (GNA) a través de un péptido enlazador de 3 aminoácidos (AAA). Ambas construcciones de proteínas de fusión también se dispusieron dentro del marco con la secuencia prepro del factor  $\alpha$  de levadura, y el extremo C-terminal en una secuencia que codifica la etiqueta (His)<sub>6</sub>, suministrada por el vector. Las construcciones fueron ensambladas por ligadura de ADN digerido por endonucleasas y fueron comprobadas por secuenciación de ADN después de la clonación.

Los clones verificados por la secuencia, que contenían Hv1a, pro-Hv1a, Hv1a/GNA o pro-Hv1a/GNA recombinante se transformaron en la cepa SMD1168H, deficiente en proteasa de *P. pastoris* y se seleccionaron utilizando el antibiótico zeocina. Los clones seleccionados se cultivaron en cultivos de matraces con agitación durante 3-4 días a 30 °C y los sobrenadantes de los cultivos se analizaron para la expresión de las proteínas recombinantes utilizando la técnica de inmunoelectrotransferencia. Esto permitió seleccionar clones altamente expresivos para su producción mediante fermentación de sobremesa. La mayoría de los clones de levadura transformados analizados mostraron pruebas de expresión de proteínas a juzgar por la presencia de bandas inmunorreactivas con el tamaño esperado en las membranas de Western (resultados no mostrados).

La fermentación de los clones seleccionados se llevó a cabo en biorreactores en condiciones ambientales controladas. El uso de la señal secretoria del factor alfa pGAP que dirige la secreción de las proteínas expresadas fuera de las células y hacia el medio de crecimiento, permitió la subsiguiente purificación de las proteínas recombinantes de los sobrenadantes de cultivos fermentados. Los sobrenadantes se obtuvieron por centrifugación, se aclararon por filtración y las proteínas recombinantes se purificaron posteriormente mediante cromatografía de afinidad (estreptactina para Hv1a y afinidad de níquel para pro-Hv1 a y pro-Hv1a/GNA). Los picos eluidos que contenían proteínas diana se desalinizaron mediante diálisis y se liofilizaron. Para obtener el rendimiento de las proteínas recombinantes, Hv1a se produjo en aproximadamente 5-10 mg/l de sobrenadante de cultivo; pro-Hv1 a se produjo en aproximadamente 40 mg/l, conforme lo estimado por la cuantificación de BCA y Hv1a/GNA en aproximadamente 40 mg/l y pro-Hv1a/GNA en aproximadamente 21 mg/l, conforme lo estimado por SDS-PAGE semicuantitativo.

Como se muestra en la Figura 2A (carriles 3 y 4), Hv1 a purificada madura marcada con Strep en 5' se separó en geles de SDS-PAGE como una única proteína de aproximadamente 6,5 kDa, comparable a la masa molecular prevista de 5,47 kDa (los geles no fueron optimizados para la separación de proteínas de bajo peso molecular). pro-Hv1a recombinante purificada se separó utilizando geles SDS-PAGE Tris-Tricina y se analizó mediante tinción de proteína total e inmunoelectrotransferencia utilizando anticuerpos anti-His (Figura 2B y C). La toxina recombinante pro-Hv1a dio una banda de proteína principal de aproximadamente 4 kDa y otras bandas más débiles en el intervalo de masa molecular de 6-16 kDa en los geles de Tris-Tricina. La banda dominante de aproximadamente 4 kDa no es inmunorreactiva con anticuerpos anti-(His)<sub>6</sub> (Figura 2C) y la masa molecular es consistente con la masa prevista (4,06 kDa) después de la escisión de la región de la etiqueta C-terminal. Previamente se había observado que las proteínas no marcadas con His y las proteínas marcadas con His de las columnas de afinidad de níquel se capturaban de otras proteínas recombinantes recuperadas de los sobrenadantes de *Pichia*. La proteína de 10 kDa que muestra una inmunoreactividad positiva con anticuerpos anti-(His)<sub>6</sub> corresponde a la masa prevista (9 kDa) para Hv1a recombinante, incluyendo la pro-región, lo que sugiere que la escisión de la pro-región está incompleta durante el procesamiento por las células de levadura. La banda de 14 kDa también inmunorreactiva con anticuerpos anti-(His)<sub>6</sub> puede representar una forma dimérica de Hv1a dado que la masa prevista de Hv1 a que contiene la región His en C-terminal pero no la pro-región es de 6,74 kDa.

Las muestras liofilizadas de pro-Hv1a/GNA, Hv1a/GNA y MODHv1a/GNA purificadas se analizaron en geles SDS-PAGE (Figura 3). Se observaron dos bandas de aproximadamente 19 kDa y 14 kDa para todas las proteínas de fusión. La masa molecular prevista para Hv1a/GNA es de 16,27 kDa, y para pro-Hv1a/GNA sin la pro-región pero con una etiqueta (His)<sub>6</sub> es de 16,95, ambas ligeramente inferiores a la banda de 19 kDa observada. Sin embargo, la separación idéntica de pro-Hv1a/GNA y Hv1a/GNA en los geles SDS-PAGE sugiere que la pro-región ha sido escindida de pro-Hv1a/GNA durante el procesamiento por las células de *P. pastoris*. La masa prevista para MODHv1a/GNA intacta es de 17,09 kDa y, en consecuencia, esta proteína es analizada como una proteína

ligeramente mayor en comparación con Hv1a/GNA y pro-Hv1a/GNA debido a la presencia de una etiqueta adicional de histidina que no está presente en Hv1a/GNA. En todos los casos, la banda más pequeña de 14 kDa es inmunorreactiva con los anticuerpos de GNA (resultados no mostrados) y se corresponde en tamaño a GNA del que se ha escindido la toxina Hv1a. Como se ha observado previamente para Hv1a/GNA (Fitches *et al.*, 2012), la relación de proteína de fusión pro-Hv1a/GNA intacta a GNA escindida se estimó en aproximadamente 1:1, a juzgar por la tinción de azul de Coomassie en los geles SDS-PAGE, mientras que la modificación de la secuencia Hv1a en MODHv1a/GNA da como resultado una mayor recuperación de la proteína de fusión intacta (relación intacta:escindida 2:1). La cuantificación de las proteínas de fusión Hv1a/GNA se basó en la comparación de la intensidad de la banda con los niveles de GNA de concentración conocida, como se muestra en la Figura 3.

**Toxicidad de inyección de proteína de fusión Hv1a, pro-Hv1a, Hv1a/GNA y pro-Hv1a/GNA recombinante en larvas de polilla de la col (*Mamestra brassicae*)**

Las inyecciones de Hv1a a dosis de hasta 100 µg de la toxina recombinante no dieron lugar a ninguna mortalidad larvaria con una supervivencia comparable a la de los controles (n=40; supervivencia >90 %). Esto demostró que la expresión del péptido de Hv1a madura sin una pro-región en el extremo N-terminal dio lugar a la producción de una toxina biológicamente inactiva, lo que sugiere que la toxina fue incorrectamente procesada y/o plegada durante la síntesis por las células de levadura. En contraposición, las inyecciones de larvas de *M. brassicae* en 3<sup>er</sup>-4<sup>o</sup> estado larvario recién eclosionadas (-30-40 mg) y 5<sup>o</sup> estado larvario (-45-55 mg) con cualquiera de pro-Hv1a, Hv1a/GNA, MODHv1a/GNA o pro-Hv1a/GNA provocó una importante mortalidad larvaria.

Como se muestra en la Figura 4A, los efectos de la pro-Hv1 a recombinante después de la inyección en larvas de 5<sup>o</sup> estado larvario fueron dependientes de la dosis. Las dosis de inyección de 10 µg y 20 µg de pro-Hv1 a/insecto dieron lugar a una mortalidad completa 24 horas después de la inyección, y la inyección de 5 µg/insecto dio lugar a una mortalidad del 80 % 24 horas después de la inyección. En la dosis más baja de 1,25 µg/insecto, todos los insectos mostraron una parálisis flácida y una ausencia temporal de alimentación, aunque algunos insectos paralizados se recuperaron y pudieron volver a alimentarse 2-3 horas después de la inyección. A partir de estos ensayos, la DL<sub>50</sub> estimada (dosis letal; 48 horas) para pro-Hv1a recombinante era de 25 µg/g insecto. Como se resume en la Tabla 1, esto es aproximadamente 3 veces menor que lo publicado anteriormente para la toxina Hv1a recombinante producida en *E. coli*, cuya DL<sub>50</sub> (72 horas) era de -69 µg/g insecto.

Como se muestra en la Figura 4B y C, las inyecciones de larvas de *M. brassicae* en 3<sup>er</sup>-4<sup>o</sup> y 5<sup>o</sup> estados larvarios con pro-Hv1a/GNA demostraron una mayor toxicidad en comparación con Hv1a/GNA. Por ejemplo, las inyecciones de 10 µg de Hv1a/GNA en larvas de 5<sup>o</sup> estado larvario dieron lugar a una mortalidad del 50 % después de 72 horas, en comparación con la mortalidad del 100 % registrada 24 horas después de la inyección con la misma dosis de pro-Hv1a/GNA. Se observó una importante mortalidad larvaria (75 %) con una dosis de pro-Hv1a/GNA de 2,5 µg/insecto, mientras que las inyecciones de 5 o 10 µg de Hv1 a/GNA no dieron lugar a ningún nivel significativo de mortalidad en las larvas en 5<sup>o</sup> estado larvario. Se observaron resultados similares después de la inyección a larvas más pequeñas en 3<sup>er</sup>-4<sup>o</sup> estado larvario (Figura 4B). Como se muestra en la Tabla 1, los valores de DL<sub>50</sub> estimados para pro-Hv1a/GNA fueron unos 10 veces más bajos (4,6 µg/g insecto) en comparación con una DL<sub>50</sub> de 55 µg/g insecto para Hv1 a/GNA. Esto demuestra que la adición de la pro-región a la construcción de Hv1a/GNA da como resultado la producción de una proteína de fusión que es significativamente más tóxica en comparación con la proteína derivada de una construcción que codifica la secuencia de toxina madura fusionada con GNA. Lo que es más sorprendente, el valor de DL<sub>50</sub> de 4,6 µg/g insecto calculado para pro-Hv1a/GNA es unas 5 veces menor que el de 25 µg/g insecto estimado para pro-Hv1 a. Esto demuestra que la vinculación de pro-Hv1 a con GNA da como resultado una proteína con mayor actividad biológica que pro-Hv1a sola o Hv1a/GNA sin la pro-región. El valor de DL<sub>50</sub> de 4,6 µg/g insecto calculado para pro-Hv1a/GNA también es más de 2 veces inferior al valor de la literatura para Hv1a nativa (a diferencia de la Hv1a recombinante; véase la tabla 1). Este valor de la literatura representa el valor de DL<sub>50</sub> en *Heliothis*, una especie del mismo orden de insectos que *M. brassicae*. Se desarrolla una hipótesis acerca de que la fusión de GNA con pro-Hv1 actúa para facilitar el correcto procesamiento y plegado de la toxina de Hv1a por las células de *P. pastoris*, permitiendo que se logren más aumentos en la actividad biológica. Las inyecciones de GNA solo hasta 40 µg/insecto no dan lugar a la mortalidad de las larvas de *M. brassicae*.

**Tabla 1: Toxicidad de las toxinas y las proteínas de fusión recombinantes en bioensayos de inyección con larvas de *Mamestra brassicae***

	Hv1a (literatura)	Hv1a	Pro-Hv1 a	Hv1a/GNA	Pro-Hv1a/GNA	Hv1a ( <i>E. coli</i> )
DL <sub>50</sub>	12 µg/g ( <i>Heliothis sp.</i> )*	>1000 µg/g	25 µg/g (48 h) < 25 µg/g (72 h)	55 µg/g (72 h)	4,6 µg/g (48 h)	69 µg/g (72 h)
* Datos no disponibles para <i>M. brassicae</i>						

**Toxicidad de ingestión de proteína de fusión Hv1a, pro-Hv1a y pro-Hv1a/GNA recombinante en larvas de**

**polilla de la col (*M. brassicae*)**

La actividad oral de proHv1a/GNA y Hv1a/GNA se evaluó por alimentación con 2 µl de gotas que contenían 20 µg de proteína de fusión a larvas de *M. brassicae* en tercer estado larvario recién eclosionadas. Los tratamientos de control fueron 20 µg de GNA o pro-Hv1 a, además de un grupo de control de proteínas no añadidas. Como se muestra en la Figura 5 y en la Tabla 2, solo se observaron efectos significativos en las larvas alimentadas con pro-Hv1a/GNA, con una mortalidad del 90 % registrada 5 días después de la ingestión de una sola gota de proteína de fusión. En contraposición, la mortalidad fue solo del 30 % para la proteína de fusión Hv1a/GNA, solo ligeramente superior a la mortalidad del 20 % y el 15 % observada en los tratamientos con GNA y pro-Hv1a, respectivamente. Se observaron resultados similares en ensayos en los que se determinó que una sola dosis de 20 µg de proteína de fusión pro-Hv1a/GNA causaba una mortalidad del 30 % en las larvas de quinto estado larvario durante 4 días, mientras que no se observó mortalidad alguna en las larvas alimentadas con 20 µg de Hv1a/ADN o pro-Hv1a (resultados no mostrados).

**Tabla 2: Toxicidad de las toxinas y las proteínas de fusión recombinantes en ensayos de alimentación con larvas de *Mamestra brassicae***

	Pro-Hv1 a	Hv1a/GNA	Pro-Hv1a/GNA	Hv1a ( <i>E. coli</i> )
<b>Porcentaje Supervivencia</b>	85 % (5 d)	70 % (5 d)	10 % (5 d)	100 % (5 d)
	600 µg/g	500 µg/g	500 µg/g	180 µg/g

**Toxicidad de ingestión de proteína de fusión Hv1a, pro-Hv1a y pro-Hv1a/GNA recombinante en los áfidos del guisante (*A. pisum*) y del cereal (*Sitobion avenae*)**

Se ensayó la actividad oral de la proteína pro-Hv1a, pro-Hv1a/GNA y Hv1a/GNA recombinante contra los áfidos del guisante y del cereal mediante su incorporación a una dieta artificial en concentraciones de 0,125 mg-0,75 mg/ml (125-750 ppm). Como se observó en el caso de las larvas de lepidópteros, se descubrió que pro-Hv1a/GNA purificada era significativamente más tóxica que Hv1a/GNA para ambas especies de áfidos (Figura 6A y B). La pro-Hv1a/GNA a 750 ppm causó el 100 % de mortalidad de los áfidos del guisante después de 3 días, mientras que la misma dosis de Hv1a/GNA provocó una mortalidad de solo el 50 % después de 8 días de alimentación. Con una dosis menor de 500 ppm, la mortalidad después de 8 días de alimentación fue del 100 % para los áfidos del guisante alimentados con pro-Hv1 a/GNA, en comparación con el 20 % para Hv1 a/GNA.

También se descubrió que pro-Hv1a/GNA era significativamente más tóxica que Hv1 a/GNA para los áfidos del cereal. Como se muestra en la Figura 6B, se registró una mortalidad del 100 % en el caso de los áfidos del cereal alimentados con dietas que contenían 250 ppm de pro-Hv1a/GNA durante 7 días, en comparación con el 60 % en el caso de los áfidos alimentados con Hv1 a/GNA. Los áfidos del cereal parecen ser más susceptibles a pro-Hv1a/GNA que los áfidos del guisante, ya que se observaron niveles significativos de mortalidad a niveles tan bajos como 125 ppm de pro-Hv1a/GNA (80 % de mortalidad después de 2 días de alimentación), mientras que no se registró mortalidad alguna en los áfidos del guisante alimentados con la misma dosis de proteína de fusión.

**Toxicidad de inyección de la proteína de fusión MODHv1a y Pro-Hv1a/GNA recombinante en babosas agrestes (*Deroceras reticulatum*)**

MODHv1a/GNA y Pro-Hv1a/GNA se sometieron a ensayo para determinar su actividad contra las babosas (*D. reticulatum*) mediante inyección en babosas adultas (-0,2 g). MODHv1a/GNA corresponde a la forma modificada de Hv1 a/GNA, en la que se ha demostrado que un solo cambio de aminoácido en el extremo C-terminal de Hv1a mejora la expresión de la proteína de fusión intacta, pero tiene una toxicidad equivalente a la de Hv1 a/GNA. Las babosas se enfriaron a 4 °C (durante -15 minutos) antes de la inyección de 25, 50 o 100 µg de Hv1a/GNA purificada resuspendida en 20 µl de PBS. La mortalidad se evaluó diariamente durante 7 días. La Figura 7 muestra la mortalidad dependiente de la dosis observada para ambos tratamientos. La mortalidad fue significativamente mayor para pro-Hv1a/GNA en comparación con MODHv1a/GNA para todas las dosis inyectadas ( $P < 0,05$ ; pruebas de Mantel Cox). Por ejemplo, Se registró una mortalidad del 100 % 3 días después de la inyección de 50 µg de pro-Hv1a/GNA, en comparación con el 10 % de mortalidad observado 5 días después de la inyección de 50 µg de MODHv1a/GNA.

**Experimentos que investigan la toxicidad de PI1a****Introducción**

Los resultados obtenidos para la proteína de fusión Hva1/GNA se ampliaron tomando una proteína de toxina cuya secuencia génica no incluía una pro-región prevista e incorporando una pro-región en la construcción de expresión basándose en secuencias similares en la base de datos de la proteína mundial. Se utilizó la toxina δ-amaurobitoxina-PMa de la araña *Pireneitega luctuosa*.

### Expresión y purificación de PI1a y PI1a/GNA recombinante

Las construcciones de expresión para la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris* se basaban en el vector pGAPZaB, que contenía un fuerte promotor constitutivo utilizado para dirigir la expresión de la proteína recombinante y que estaba diseñado para integrarse en el genoma del huésped en el locus *GAPDH*, dando transformantes estables. Las construcciones de expresión para la producción de PI1a recombinante contenían una secuencia codificante sintética correspondiente a la secuencia de aminoácidos publicada para la toxina designada PI1a, dispuesta dentro del marco C-terminal en una secuencia que codifica la secuencia prepro del factor  $\alpha$  de levadura. Las construcciones que contenían pro-regiones de toxinas se insertaron entre la secuencia prepro del factor  $\alpha$  de levadura y la secuencia de toxina de PI1a. Las pro-regiones utilizadas fueron tomadas de la toxina estrechamente relacionada U3-agatoxina-Ao1b procedente de la araña *Agelena orientalis* (una secuencia de ADNc que incluye que la pro-región no está disponible para PI1a), designada Ao1bPro-PI1a, y de la pro-región para la atracotoxina de Hv1a, tal y como se ha descrito previamente, designada Hv1aPro-PI1a. Las construcciones de expresión también contenían secuencias C-terminales que codificaban el epítipo myc y la etiqueta (His)<sub>6</sub>, suministrada por el vector.

Se crearon tres construcciones de expresión para la producción de la proteína de fusión PI1a/GNA recombinante y todas contenían la secuencia codificante PI1a madura fusionada al extremo N-terminal de una secuencia codificante correspondiente a los residuos 1-105 de lectina de campanilla de invierno (GNA) a través de un péptido enlazador de 3 aminoácidos; de nuevo, las proteínas de fusión se dispusieron dentro del marco del extremo C-terminal en una secuencia prepro del factor  $\alpha$ , y en el extremo N-terminal en una secuencia que codifica la etiqueta (His)<sub>6</sub>, suministrada por el vector. Las construcciones de proteínas de fusión modificadas también contenían las pro-regiones de Ao1b y Hv1a, como se ha descrito anteriormente, insertadas entre la secuencia prepro del factor  $\alpha$  de levadura y la secuencia codificante madura de PI1a; éstas fueron designadas Ao1bPro-PI1a/GNA y Hv1aPro-PI1a/GNA. Las construcciones fueron ensambladas por restricción-ligadura y fueron comprobadas por secuenciación de ADN después de la clonación.

Los clones verificados de las construcciones de expresión se transformaron en la cepa SMD1168H de *P. pastoris* deficiente en proteasa, utilizando la selección de antibióticos (zeocina) para los transformantes. Se obtuvieron aproximadamente 50 colonias resistentes para cada construcción de expresión. Se analizó el sobrenadante de cultivos de clones seleccionados cultivados en cultivos de matraz de agitación para la producción de proteínas recombinantes por medio de inmunoelectrotransferencia, para permitir la selección de clones que produzcan los niveles más altos de proteínas de fusión PI1a y PI1a/GNA. La identificación selectiva de un gran número de clones de levadura transformados no fue necesaria, ya que la mayoría de los clones estaban expresando proteínas recombinantes, a juzgar por la presencia de bandas inmunorreactivas del tamaño esperado en membranas de Western de sobrenadantes de cultivo (resultados no mostrados).

Para cada construcción, el clon mejor expresado de los identificados selectivamente en cultivos a pequeña escala fue seleccionado para la producción de proteínas a gran escala mediante fermentación de sobremesa. Los sobrenadantes de los cultivos se purificaron mediante cromatografía de afinidad de níquel y los picos eluidos se desalinizaron mediante diálisis y se liofilizaron. Los rendimientos de las proteínas recombinantes eran comparables a los de otras proteínas de fusión antes de la optimización; PI1a se produjo en aproximadamente 26 mg/l, Ao1bPro-PI1a en aproximadamente 32 mg/l, PI1a/GNA en aproximadamente 21 mg/l, Ao1bPro-PI1a/GNA en aproximadamente 32 mg/l y Hv1aPro-PI1a en aproximadamente 13 mg/l conforme la estimación de un análisis semicuantitativo.

Las toxinas de PI 1a recombinantes purificadas se analizaron mediante SDS-PAGE e inmunoelectrotransferencia (Figura 8). La toxina recombinante PI1a producida por la construcción sin la pro-región añadida funcionó como una doble banda estrechamente espaciada con un peso molecular indicado de aproximadamente 18 kDa en los geles SDS-PAGE (Figura 8A); ambas bandas eran inmunorreactivas con anticuerpos anti-(His)<sub>6</sub>. El peso molecular previsto de PI 1a recombinante, incluyendo las secuencias de etiqueta es de 6,87 kDa. La doble banda de la toxina era reproducible con diferentes geles, muestras y el uso de agentes reductores antes de la electroforesis, pero se consideraba un artefacto del sistema de gel, posiblemente como resultado de una pobre unión del SDS al polipéptido. Cuando las mismas muestras fueron pretratadas con urea 6 M, PI1a dio una sola banda con un peso molecular indicado de 14 kDa (Figura 8B); el cambio de movilidad es indicativo de artefactos de gel, y la banda única indica la homogeneidad del producto. Análisis posteriores sobre geles que contienen urea dieron bandas únicas para PI1a, con pesos moleculares indicados de ~11 kDa sin bloquear los residuos de cisteína y ~9 kDa después del tratamiento con yodoacetamida para bloquear los residuos de cisteína; estos resultados son un diagnóstico de pesos moleculares incorrectos en condiciones "normales" debido a la estructura secundaria residual y a las interacciones entre los residuos de cisteína antes o durante la electroforesis. La secuenciación del extremo N-terminal verificó el procesamiento incompleto del sitio de escisión de Kex2 pGAPZaB, lo que dio lugar a un residuo adicional de ácido glutámico y alanina en el extremo N-terminal y a una masa de producto prevista de 7,07 kDa. Curiosamente, La PI1a producida por la construcción modificada que incorpora la pro-región (Ao1bPro-PI1a) funcionaba como una doble banda estrechamente espaciada a ~9 kDa en condiciones "normales" de SDS-PAGE, con algunas pruebas de una banda difusa de mayor peso molecular (Figura 8C). La masa molecular prevista del péptido incluyendo la pro-región adicional es de 8,6 kDa. La secuenciación del extremo N-terminal confirmó que la pro-región estaba presente en el

producto proteico y que se había producido una escisión entre el residuo de alanina e isoleucina primario en la pro-región Ao1b, lo que daba una masa molecular prevista de 8,46 kDa.

5 La proteína de fusión P11a/GNA "normal" (es decir, derivada de una construcción que no contenía una pro-región adicional) se separó en los geles de SDS-PAGE como dos proteínas principales de los tamaños indicados de 18 y 21 kDa (Figura 9A). La proteína de 18 kDa, inmunorreactiva con anticuerpos anti-GNA (resultados no mostrados) correspondió en masa a la prevista para P11a/GNA recombinante (17,1 kDa). La proteína de 21 kDa también era inmunorreactiva con anticuerpos anti-GNA, y tenía una secuencia del extremo N-terminal idéntica a la banda de 18 kDa. El tratamiento con la enzima desglucosilante PNGasa F, que escinde las cadenas laterales de carbohidratos unidas a los residuos de Asn a través de los enlaces N-glicosídicos, eliminó esta banda, mientras que la intensidad de la banda "correcta" para la proteína de fusión P11a/GNA aumentó como resultado del tratamiento (Figura 9B). Este resultado sugiere que la banda adicional se debe a la glicosilación "central" de la proteína de fusión por *P. pastoris* durante la síntesis y la secreción. La GNA no contiene ningún sitio potencial de N-glicosilación, pero la secuencia de la toxina de P11a contiene un sitio potencial de N-glicosilación (N-X-S/T) en Asn-35. La secuencia del extremo N-terminal de la banda única se determinó como E-A-A-A-G-, conforme lo esperado para la proteína de fusión después de la eliminación de la región prepro del factor  $\alpha$  de levadura durante la traducción y la secreción de *P. pastoris*. Además, una pequeña cantidad de una banda con un peso molecular indicado similar al del GNA recombinante (12,7 kDa), que era inmunorreactiva a los anticuerpos anti-GNA (resultados no mostrados), sugiere que durante la producción y la purificación se produjo una pequeña cantidad de escisión de la proteína de fusión en sus componentes. La relación de proteína de fusión P11a/GNA intacta a GNA escindida se estimó como -30:1, a juzgar por la tinción de azul de Coomassie en los geles SDS-PAGE.

25 Ambas proteínas de fusión P11a/GNA derivadas de construcciones que contienen secuencias pro-región adicionales (es decir, Ao1bPro-P11a/GNA y Hv1aPro-P11a/GNA) se separaron en los geles SDS-PAGE como dos bandas de tinción principales de aproximadamente 17 y 21 kDa (Figura 9C y D). La proteína más pequeña de 17 kDa corresponde en masa a la prevista para Ao1bPro-P11a/GNA y Hv1aPro-P11a/GNA (16,94 kDa) tras la eliminación de la pro-región, lo que sugiere que en ambos casos la pro-región es eliminada durante el procesamiento por las células de levadura. La banda de proteína de 21 kDa es la que más probablemente represente a la proteína glicosilada, como se observó para P11a/GNA. Ao1bPro-P11a/GNA y Hv1aPro-P11a/GNA, ambas expresadas como proteína de fusión 100 % intacta, sin pruebas de SDS-PAGE e inmunoelectrotransferencia para la escisión entre las secuencias de toxina y GNA.

### 35 **Toxicidad de inyección de la proteína P11a y Ao1bPro-P11a recombinante en larvas de polilla de la col (*M. brassicae*)**

A las larvas de *M. brassicae* en 5º estado larvario recién eclosionadas (~45-55 mg de peso) se les inyectó proteínas recombinantes purificadas para evaluar y comparar la actividad *in vivo* de las toxinas y las proteínas de fusión. La Figura 10A muestra la supervivencia de las larvas después de la inyección con P11a y la Figura 10B muestra la supervivencia después de la inyección con dosis comparables de P11a y Ao1bPro-P11a. Las larvas inyectadas con la toxina de P11a mostraron todas parálisis flácida a las 1-2 horas (poca movilidad y casi una ausencia total de alimentación). La mayor parte de la mortalidad se observó en las primeras 24 horas. Después de un periodo de parálisis, algunos insectos mostraron una recuperación progresiva y pudieron volver a alimentarse. Los efectos de la P11a fueron dependientes de la dosis, con una mortalidad después de 24 horas que varía entre 75 % con 20 µg de toxina/insecto y 20 % con 1,25 µg de toxina/insecto. Incluso con altas dosis de toxina, no se observó una mortalidad completa después de 72 horas. A partir de estos ensayos, la DL<sub>50</sub> estimada (48 horas) para P11a recombinante fue de 4,1 µg/insecto u 82 µg/g insecto, basándose en un peso medio de las larvas de 50 mg (véase la Tabla 3). El valor de DL<sub>50</sub> de la literatura para P11a nativa (en contraposición a P11a recombinante) es de 9,5 µg/g. Este valor de la literatura representa el valor de DL<sub>50</sub> en *Spodoptera*, una especie del mismo orden de insectos que *M. brassicae*.

50 La P11a recombinante producida a partir de la construcción de expresión modificada, incluyendo la pro-región de U3-agatoxina-Ao1b, mostró efectos tóxicos similares a los de P11a, pero fue consistentemente más eficaz en dosis más bajas que P11a producida por la construcción sin esta secuencia adicional (Figura 10B). De nuevo, los principales efectos de Ao1bPro-P11a en la mortalidad se observaron durante las primeras 24 horas, con una mortalidad que varía entre 80 % con 10 µg de toxina/insecto y 30 % con 1,25 µg de toxina/insecto. En estos ensayos, hubo una tendencia a que la mortalidad causada por la toxina producida por la construcción modificada siguiera aumentando hasta las 72 horas y la dosis más alta de toxina (10 µg de toxina/insecto) causó una mortalidad del 100 % a las 72 horas. Los ensayos llevados a cabo al mismo tiempo con P11a producida por la construcción no modificada dieron resultados similares al ensayo anterior y la comparación directa entre las dos muestras del mismo ensayo mostró que las diferencias entre P11a producida por las construcciones no modificadas y modificadas eran estadísticamente significativas cuando se analizaron curvas de supervivencia a dosis idénticas (Figura 10B). La DL<sub>50</sub> estimada (48 horas) para P11a recombinante producida por la construcción modificada (Ao1bPro-P11a) fue de -1,0 µg/insecto, o 21 µg/g de insecto, basándose en un peso medio de larvas de 50 mg; esto equivale a un aumento de la toxicidad de -4 veces (véase la Tabla 3).

65 **Tabla 3: Toxicidad de las toxinas y las proteínas de fusión recombinantes en bioensayos de inyección con larvas de *Mamestra brassicae***

	PI1a (literatura)	PI1a	Ao1bPro- PI1a	PI1a/GNA	Ao1bPro-PI1a/GNA	Hv1aPro-PI1a/GNA
DL <sub>50</sub>	9,5 µg/g ( <i>Spodoptera</i> sp.)*	82 µg/g	21 µg/g	11 µg/g (28 µg/g fusión)	7,6 µg/g (19 µg/g fusión)	<5 µg/g (<12 µg/g fusión)
* datos no disponibles para <i>M. brassicae</i>						

La proteína de fusión PI1a/GNA también causaba parálisis y mortalidad cuando se inyectaba en las larvas de *M. brassicae* y era significativamente más eficaz que la toxina sola (Figura 11A). Cuando se inyectó a las larvas 1,25-10 µg de proteína de fusión/insecto (equivalente a 0,50-4,0 µg de PI1a/insecto, ya que el peso molecular de PI1a recombinante es -0,404 del de la proteína de fusión PI1a/GNA), se observó una mortalidad significativa en todas las dosis, y la mortalidad completa después de 24 horas se observó en la dosis más alta (Figura 11A). Al igual que con PI1a, la mayor parte de la mortalidad se observó dentro de las primeras 24 horas del ensayo y los efectos eran dependientes de la dosis, variando de 100 % de mortalidad a 10 µg de proteína de fusión/insecto hasta 35 % de mortalidad a 1,25 µg de proteína de fusión/insecto. La mortalidad a esta dosis más baja de proteína de fusión aumentó al 65 % después de 72 horas, mientras que la mortalidad por la inyección de 1,25 µg de toxina sola no cambió del 20 % entre 24 y 72 horas. A partir de estos ensayos, la DL<sub>50</sub> estimada (48 horas) para la proteína de fusión PI1a/GNA recombinante fue de 1,4 µg/insecto o 28 µg/g insecto, basándose en un peso medio de larvas de 50 mg. La DL<sub>50</sub> es equivalente a 0,56 µg de toxina PI1a por insecto, haciendo que la proteína de fusión PI1a/GNA sea -7 veces más activa que la toxina producida por la construcción no modificada, y -2 veces más activa que la toxina producida por la construcción modificada Ao1b-Pro-PI1a, sobre una base molar. Una relación similar se obtiene utilizando las cifras de mortalidad a las 72 horas. Las comparaciones directas de la mortalidad producida por dosis idénticas de toxina y proteínas de fusión muestran que los tres tratamientos son diferentes entre sí, y entre el control, en p<0,0001 (ANOVA). En todos estos ensayos, no se observó ninguna mortalidad de los insectos inyectados de control durante las 72 horas.

Como se observó con la toxina PI 1a, la adición de la pro-región Ao1b a la construcción de expresión de la proteína de fusión PI1a/GNA dio como resultado un producto proteico con mayor actividad biológica (Figura 11B). El producto proteico de fusión derivado de esta construcción tenía una DL<sub>50</sub> estimada (48 horas) de 0,94 µg/insecto, con un aumento de la mortalidad en todas las dosis excepto la más alta. La adición de una pro-región alternativa de la toxina pro-HV1a, a la construcción de expresión PI1a/GNA también mejoró la actividad biológica de la proteína de fusión resultante (Figura 11C); esta proteína tenía una DL<sub>50</sub> estimada (48 horas) de <0,6 µg/insecto, aunque los valores de mortalidad general fueron similares a los de la proteína de fusión pro-Ao1b-PI1a/GNA. Estos datos sugieren que puede obtenerse un doble aumento de la toxicidad incluyendo pro-regiones en las construcciones de expresión para PI1a/GNA.

#### **Toxicidad de ingestión de PI1a/GNA, Ao1bPro-PI1a/GNA y Pro-Hv1aPI1a/GNA recombinantes en larvas de polilla de la col (*M. brassicae*)**

También se observó un aumento similar de la toxicidad de las proteínas de fusión derivadas de construcciones de expresión, incluyendo las pro-regiones al observado en los ensayos de inyección en los ensayos de alimentación con gotas con larvas de *M. brassicae* en 3<sup>er</sup> estado larvario (Figura 12). Tras la ingestión de una sola gota de 2 µl que contiene 20 µg de proteína de fusión, la mortalidad después de 5 días fue del 40 % para PI1a/GNA; 50 % para Ao1bPro-PI1a/GNA y 70 % para Hv1aPro-PI1a/GNA (datos resumidos en la Tabla 4). Se observaron reducciones mínimas de la supervivencia (0-20 %) en los tratamientos de control en los que las larvas se alimentaron con una toxina de 30 µg o GNA y las curvas de supervivencia de los controles fueron significativamente diferentes de los tratamientos con proteínas de fusión. Esto proporciona más pruebas de que la adición de pro-regiones a la construcción de PI1a/GNA da lugar a una mayor actividad biológica. En cuanto a los estudios de inyección, se observó que el uso de la pro-región de Hv1a daba como resultado el mayor aumento de la toxicidad sobre la proteína de fusión PI1a/GNA no modificada.

**Tabla 4: Toxicidad de las toxinas y las proteínas de fusión recombinantes en ensayos de alimentación oral con larvas de *Mamestra brassicae***

	PI1a (recombinante)	Ao1bPro-Hv1a	PI1a/GNA	Ao1bPro- PI1a/GNA	Hv1aPro- PI1a/GNA
Porcentaje	90 % (5 d)	80 % (5 d)	60 % (5 d)	50 % (5 d)	30 % (5 d)
Supervivencia	400 µg/g	400 µg/g	500 µg/g	500 µg/g	500 µg/g

#### **Referencias**

- Becker y Guarente High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods Enzymol.* (1991) **194**:182-187.
- 5 Berent S.L., Mahmoudi M., Torczynski R.M., Bragg P.W., Bollon A.P. Comparison of oligonucleotide and long DNA fragments as probes in DNA and RNA dot, southern, northern, colony and plaque hybridizations. *Biotechniques.* (1985) 3:208-220
- Douglas, A.E. y Prosser, W.A. Synthesis of the essential amino acid tryptophan in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) symbiosis. *Journal of Insect Physiology* (1992) 38: 565-568.
- 10 Fitches, E.C., Pyati, P., King, G.F. y Gatehouse, J.A. Fusion to snowdrop lectin magnifies the oral activity of insecticidal  $\omega$ -Hexatoxin-Hv1a peptide by enabling its delivery to the central nervous system. *PLoS One* (2012) 7:e39389
- 15 Fitches, E., Woodhouse S.D. Edwards, J.P., Gatehouse, J.A. *In vitro* and *in vivo* binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin;GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*; Con A) lectins within tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae; mechanisms of insecticidal action. *Journal of Insect Physiology* (2001) 47:777-787.
- 20 Fitches, E., *et al.*, New environmentally-friendly technologies for slug control based on orally-delivered fusion proteins containing specific molluscicidal toxins. *Novara* (2012) 1-85.
- Fletcher J.I., Smith R., O'Donoghue S.I., Nilges M., Connor M., Howden M.E.H., Christie M.J., King G.F. The structure of a novel insecticidal neurotoxin, omega-atracotoxin-HV1, from the venom of an Australian funnel web spider. *Nature Structural Biology* (1997) 4:559-566.
- 25 Kaas, Q., Westermann, J.C. y Craik, D.J. Conopeptide characterization and classifications: an analysis using ConoServer. *Toxicon* (2010) 55:1491-1509
- 30 Khan, S. A., Zafar, Y., Briddon, R.W., Malik, K.A. y Mukhtar, Z. Spider venom toxin protects plants from insect attack. *Trangenic Research* (2006) 15:349-357
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. y von Heijne, G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* (1997) 10:1-6
- 35 Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: 3ª edición
- Sherman *et al* (1986) *Methods in Yeast Genetics, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour, NY.
- 40 Southern. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol* (1975) 98:503-517
- Tedford, Sollod, Maggio y King. Australian funnel-web spiders; master insecticide chemists. *Toxicon* (2004) 43:601-618
- 45 Windley, Herzig, Dziemborowicz, Hardy, King y Nicholson. Spider-Venom Peptides as Bioinsecticides. *Toxins* (2012) 4:191-227
- 50 Wong, E.S., Hardy, M.C., Wood, D., Bailey, T. y King, G.F. SVM-based prediction of propeptide cleavage sites in spider toxins identifies toxin innovation in an Australian tarantula. *PLoS One* (2013) 8(7):e66279

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Universidad de Durham  
Organismo de Investigación sobre Alimentación y Medio Ambiente (FERA)
- 55 <120> Mejoras de proteínas de fusión pesticidas
- <130> PM336301WO
- 60 <150> Documento GB 1321938.1  
<151> 11-12-2013
- <160> 19
- 65 <170> PatentIn versión 3.5

ES 2 796 077 T3

<210> 1  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> *Hadronyche versuta*  
 5  
 <400> 1  
  
 Glu Asp Thr Arg Ala Asp Leu Gln Gly Gly Glu Ala Ala Glu Lys Val  
 1 5 10 15  
  
 Phe Arg Arg  
  
 10 <210> 2  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> *Agelena orientalis*  
 15 <400> 2  
  
 Ile Ser Tyr Glu Glu Gly Lys Glu Leu Phe Gln Lys Glu Arg  
 1 5 10  
  
 20 <210> 3  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Desconocido  
  
 25 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
  
 <400> 3  
 tactgcagca gaagatacta gagct 25  
  
 30 <210> 4  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Desconocido  
  
 35 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
  
 <400> 4  
 attctagaat cacatctctt aac 23  
 40  
 <210> 5  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Desconocido  
 45  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
  
 <400> 5  
 atcgggccgc atcacatctc ttaac 25  
 50  
 <210> 6  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> *Hadronyche versuta*  
 55  
 <400> 6

ES 2 796 077 T3

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

5 <210> 7  
 <211> 138  
 <212> PRT  
 <213> *Hadronyche versuta*

10 <400> 7

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

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 Trp Ser His Pro Gln Phe  
 85 90 95

Glu Lys Gly Leu Gln Ser Pro Thr Cys Ile Pro Ser Gly Gln Pro Cys  
 100 105 110

Pro Tyr Asn Glu Asn Cys Cys Ser Gln Ser Cys Thr Phe Lys Glu Asn  
 115 120 125

Glu Asn Gly Asn Thr Val Lys Arg Cys Asp  
 130 135

15 <210> 8  
 <211> 170  
 <212> PRT  
 <213> *Hadronyche versuta*

20 <400> 8

ES 2 796 077 T3

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

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 Glu Asp Thr Arg Ala  
 85 90 95

Asp Leu Gln Gly Gly Glu Ala Ala Glu Lys Val Phe Arg Arg Ser Pro  
 100 105 110

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

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

Arg Cys Asp Ala Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn  
 145 150 155 160

Ser Ala Val Asp His His His His His His  
 165 170

5 <210> 9  
 <211> 238  
 <212> PRT  
 <213> *Hadronyche versuta*

10 <400> 9

ES 2 796 077 T3

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

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 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 Lys 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  
 225 230 235

5 <210> 10  
 <211> 263  
 <212> PRT

ES 2 796 077 T3

<213> *Hadronyche versuta*

<400> 10

```

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

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 Glu Asp Thr Arg Ala
          85           90           95

Asp Leu Gln Gly Gly Glu Ala Ala Glu Lys Val Phe Arg Arg Ser Pro
          100          105          110

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

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

Arg Cys Asp Ala Ala Ala Asp Asn Ile Leu Tyr Ser Gly Glu Thr Leu
145          150          155          160

Ser Thr Gly Glu Phe Leu Asn Tyr Gly Ser Phe Val Phe Ile Met Gln
          165          170          175

Glu Asp Cys Asn Leu Val Leu Tyr Asp Val Asp Lys Pro Ile Trp Ala
          180          185          190

Thr Asn Thr Gly Gly Leu Ser Arg Ser Cys Phe Leu Ser Met Gln Thr
195          200          205

```

ES 2 796 077 T3

Asp Gly Asn Leu Val Val Tyr Asn Pro Ser Asn Lys Pro Ile Trp Ala  
 210 215 220

Ser Asn Thr Gly Gly Gln Asn Gly Asn Tyr Val Cys Ile Leu Gln Lys  
 225 230 235 240

Asp Arg Asn Val Val Ile Tyr Gly Thr Asp Arg Trp Ala Thr Gly Val  
 245 250 255

Asp His His His His His His  
 260

<210> 11  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> *Pireneitega luctuosa*  
 <400> 11

5

Gly Cys Leu Gly Glu Gly Glu Lys Cys Ala Asp Trp Ser Gly Pro Ser  
 1 5 10 15

Cys Cys Asp Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ser Met Pro Tyr Cys Arg  
 20 25 30

Cys Arg Asn Asn Ser  
 35

10

<210> 12  
 <211> 151  
 <212> PRT  
 <213> *Pireneitega luctuosa*  
 <400> 12

15

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

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

ES 2 796 077 T3

Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Ala Ala Gly Cys Leu Gly Glu  
85 90 95

Gly Glu Lys Cys Ala Asp Trp Ser Gly Pro Ser Cys Cys Asp Gly Phe  
100 105 110

Tyr Cys Ser Cys Arg Ser Met Pro Tyr Cys Arg Cys Arg Asn Asn Ser  
115 120 125

Ala Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val  
130 135 140

Asp His His His His His His  
145 150

<210> 13  
<211> 164  
<212> PRT  
<213> *Pireneitega luctuosa*

<400> 13

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

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 Ile Ser Tyr Glu Glu  
85 90 95

Gly Lys Glu Leu Phe Gln Lys Glu Arg Gly Cys Leu Gly Glu Gly Glu  
100 105 110

Lys Cys Ala Asp Trp Ser Gly Pro Ser Cys Cys Asp Gly Tyr Cys Ser  
115 120 125

Cys Arg Ser Met Pro Tyr Cys Arg Cys Arg Asn Asn Ser Ala Leu Glu  
130 135 140

5

10

ES 2 796 077 T3

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His  
 145 150 155 160

His His His His

5 <210> 14  
 <211> 244  
 <212> PRT  
 <213> *Pireneitega luctuosa*

10 <400> 14

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

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 Gly Cys Leu Gly Glu  
 85 90 95

Gly Glu Lys Cys Ala Asp Trp Ser Gly Pro Ser Cys Cys Asp Gly Phe  
 100 105 110

Tyr Cys Ser Cys Arg Ser Met Pro Tyr Cys Arg Cys Arg Asn Asn Ser  
 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

ES 2 796 077 T3

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

<210> 15

<211> 256

<212> PRT

<213> *Pireneitega luctuosa*

<400> 15

5

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

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 Ile Ser Tyr Glu Glu  
 85 90 95

Gly Lys Glu Leu Phe Gln Lys Glu Arg Gly Cys Leu Gly Glu Gly Glu  
 100 105 110

Lys Cys Ala Asp Trp Ser Gly Pro Ser Cys Cys Asp Gly Cys Ser Cys  
 115 120 125

Arg Ser Met Pro Tyr Cys Arg Cys Arg Asn Asn Ser Ala Ala Ala Asp  
 130 135 140

Asn Ile Leu Tyr Ser Gly Glu Thr Leu Ser Thr Gly Glu Phe Leu Asn  
 145 150 155 160

10

ES 2 796 077 T3

Tyr Gly Ser Phe Val Phe Ile Met Gln Glu Asp Cys Asn Leu Val Leu  
 165 170 175

Tyr Asp Val Asp Lys Pro Ile Trp Ala Thr Asn Thr Gly Gly Leu Ser  
 180 185 190

Arg Ser Cys Phe Leu Ser Met Gln Thr Asp Gly Asn Leu Val Val Tyr  
 195 200 205

Asn Pro Ser Asn Lys Pro Ile Trp Ala Ser Asn Thr Gly Gly Gln Asn  
 210 215 220

Gly Asn Tyr Val Cys Ile Leu Gln Lys Asp Arg Asn Val Val Ile Tyr  
 225 230 235 240

Gly Thr Asp Arg Trp Ala Thr Gly Val Asp His His His His His His  
 245 250 255

<210> 16  
 <211> 262  
 <212> PRT  
 <213> *Pireneitega luctuosa*

5

<400> 16

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

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 Glu Asp Thr Arg Ala  
 85 90 95

Asp Leu Gln Gly Gly Glu Ala Ala Glu Lys Val Phe Arg Arg Gly Cys  
 100 105 110

Leu Gly Glu Gly Glu Lys Cys Ala Asp Trp Ser Gly Pro Cys Cys Asp  
 115 120 125

10

ES 2 796 077 T3

Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ser Met Pro Tyr Cys Arg Cys Arg Asn  
 130 135 140

Asn Ser Ala Ala Ala Asp Asn Ile Leu Tyr Ser Gly Glu Thr Leu Ser  
 145 150 155 160

Thr Gly Glu Phe Leu Asn Tyr Gly Ser Phe Val Phe Ile Met Gln Glu  
 165 170 175

Asp Cys Asn Leu Val Leu Tyr Asp Val Asp Lys Pro Ile Trp Ala Thr  
 180 185 190

Asn Thr Gly Gly Leu Ser Arg Ser Cys Phe Leu Ser Met Gln Thr Asp  
 195 200 205

Gly Asn Leu Val Val Tyr Asn Pro Ser Asn Lys Pro Ile Trp Ala Ser  
 210 215 220

Asn Thr Gly Gly Gln Asn Gly Asn Tyr Val Cys Ile Leu Gln Lys Asp  
 225 230 235 240

Arg Asn Val Val Ile Tyr Gly Thr Asp Arg Trp Ala Thr Gly Val Asp  
 245 250 255

His His His His His His  
 260

5 <210> 17  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

10 <220>  
 <223> Artificial  
 <400> 17

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys  
 1 5

15 <210> 18  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

20 <220>  
 <223> Secuencia de banda única  
 <400> 18

ES 2 796 077 T3

Glu Ala Ala Ala Gly  
1 5

<210> 19  
<211> 56  
<212> PRT  
5 <213> *Hadronyche versuta*  
<400> 19

Glu Asp Thr Arg Ala Asp Leu Gln Gly Gly Glu Ala Ala Glu Lys Val  
1 5 10 15

Phe Arg Arg Ser Pro Thr Cys Ile Pro Ser Gly Gln Pro Cys Pro Tyr  
20 25 30

Asn Glu Asn Cys Cys Ser Gln Ser Cys Thr Phe Lys Glu Asn Glu Asn  
35 40 45

Gly Asn Thr Val Lys Arg Cys Asp  
50 55

10

## REIVINDICACIONES

1. Un método para aumentar la actividad biológica de una toxina recombinante, comprendiendo el método:

5 proporcionar una construcción de ácido nucleico que comprende:

- (i) una secuencia de toxina de artrópodo, o una secuencia de un fragmento o de una variante biológicamente activos de la misma, conservando la variante al menos un 50 % de la actividad biológica de la toxina de artrópodo y teniendo una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 75 % de identidad con la
- 10 secuencia de la toxina de artrópodo, operativamente vinculada a  
 (ii) una secuencia de ácido nucleico que codifica una pro-región de artrópodo; y  
 (iii) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora, o un fragmento o una variante de la misma; y

15 expresar una proteína de fusión, comprendiendo la proteína de fusión la toxina de artrópodo, o un fragmento o una variante biológicamente activos de la misma vinculados a la proteína portadora o a un fragmento o a una variante de la misma;

20 en donde la pro-región de artrópodo es una secuencia entre una secuencia de péptido señal y un extremo N-terminal de una proteína madura; y  
 en donde la proteína portadora, el fragmento o la variante de la misma son capaces de mediar en la translocación de la proteína de fusión del intestino de un invertebrado.

25 2. Una construcción de ácido nucleico para aumentar la actividad biológica de una toxina recombinante, que comprende:

- (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica una pro-región de artrópodo,  
 (ii) una secuencia de ácido nucleico de una proteína portadora, o un fragmento o una variante de la misma; y  
 (iii) un sitio de restricción adyacente a la secuencia de ácido nucleico de la proteína portadora o de un fragmento
- 30 o de una variante de la misma, en donde una secuencia del gen de toxina de artrópodo, o una secuencia de un fragmento o de una variante biológicamente activos de la misma, puede ser insertada dentro del marco, conservando la variante al menos un 50 % de la actividad biológica de la toxina de artrópodo y teniendo una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 75 % de identidad con la secuencia de la toxina de artrópodo;

35 en donde la pro-región de artrópodo es una secuencia entre una secuencia de péptido señal y un extremo N-terminal de una proteína madura; y  
 en donde la proteína portadora, el fragmento o la variante de la misma son capaces de mediar en la translocación de la proteína de fusión del intestino de un invertebrado.

40 3. La construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2, comprende además la secuencia del gen de toxina de artrópodo o la secuencia de un fragmento o de una variante biológicamente activos de la misma, insertados en el sitio adyacente a la secuencia de ácido nucleico de la proteína portadora o de un fragmento o de una variante de la misma.

45 4. La construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la secuencia del gen de toxina de artrópodo, o la secuencia de un fragmento o de una variante biológicamente activos de la misma, no está asociada a una secuencia de ácido nucleico que codifica una pro-región de artrópodo en la secuencia de origen natural o está asociada a una secuencia de ácido nucleico diferente que codifica una pro-región de artrópodo en la secuencia de origen natural.

50 5. El método o la construcción de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4, en donde la toxina es una toxina pesticida.

55 6. El método o la construcción de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-5, en donde:

- (i) la toxina se selecciona entre el grupo que consiste en  $\omega$ -ACTX-Hv1a o  $\kappa$ -ACTX-Hv1c de *Hadronyche versuta*,  $\delta$ -amaurobitoxina-PI1a de *Pireneitega luctuosus*, las toxinas Sfl1-8 de *Segestria florentina*, la toxina ButalT de *Buthus mesotamulus*, la terafotoxina Ec2a de *Eucratoscelus constrictus*, cirtoautoxina As1a de *Apomastus schlingerii* o sicaritoxina Li1 a de *Loxosceles intermedia*; y/o
- 60 (ii) la toxina comprende un péptido de 20-100 residuos de aminoácidos.

65 7. El método o la construcción de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-6, en donde la toxina es:

- (i)  $\omega$ -ACTX-Hv1a, o un fragmento o una variante biológicamente activos de la misma; o

(ii)  $\delta$ -amaurobitoxina-PI1a, o un fragmento o una variante biológicamente activos de la misma.

8. El método o la construcción de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la pro-región de artrópodo puede identificarse por medio de las etapas de:

5           comparar la secuencia determinada para una proteína aislada de su fuente normal con la secuencia prevista por el gen que la codifica;  
 10          identificar las secuencias N-terminales no presentes en el producto proteico final;  
 10          identificar una secuencia de péptido señal en la secuencia N-terminal no presente en el producto proteico final; e  
 10          identificar una secuencia de pro-región entre la secuencia de péptido señal y el extremo N-terminal de una proteína madura, opcionalmente mediante la eliminación de la secuencia de péptido señal de la secuencia N-terminal no presente en el producto proteico final.

9. El método o la construcción de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde

15           (i) la pro-región de artrópodo comprende la secuencia de aminoácidos EDTRADLQGGEAAEKVFRR, o un fragmento o una variante de la misma; o  
 20           (ii) la pro-región de artrópodo comprende la secuencia de aminoácidos ISYEEGKELFQKER, o un fragmento o una variante de la misma,

en donde el fragmento o la variante de la misma de (i) o (ii) conserva la actividad biológica de la pro-región.

10. El método o la construcción de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:

25           (i) la proteína portadora es una lectina; y/o  
 30           (ii) la proteína portadora es una lectina vegetal seleccionada entre: lectina de la campanilla de invierno (GNA), lectina de ajo *Allium sativum*, lectina de guisante *Pisum sativum* (P-lec), lectina de cacahuete *Arachis hypogaea*, lectina de judía verde (PHA, *Phytohaemagglutinin*), o un fragmento o una variante de las mismas; y/o  
 30           (iii) la proteína portadora es GNA.

11. El método o la construcción de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:

35           (i) las construcciones de ácido nucleico son construcciones de expresión; y/o  
 40           (ii) las construcciones de ácido nucleico comprenden además una secuencia que codifica una etiqueta de afinidad, opcionalmente una etiqueta His.

12. Una composición pesticida que comprende una proteína de fusión producida de acuerdo con uno de los métodos descritos en las reivindicaciones 1 o 5-11, opcionalmente en donde:

45           (i) la composición se encuentra en forma de solución, emulsión, pulverización, suspensión, polvo, espuma, pasta, gránulo, aerosol, cápsula u otro material finamente o gruesamente dividido o agente de impregnación para un material natural o sintético; y/o  
 50           (ii) la composición se encuentra en forma de pulverización o suspensión mezclada con diluyentes, adyuvantes, conservantes, dispersantes, disolventes y/o agentes emulsionantes adecuados; y/o  
 50           (iii) la composición se encuentra en una mezcla íntima o física junto con otros insecticidas, sustancias para promover o regular el crecimiento, herbicidas, fungicidas y/o agentes sinérgicos conocidos; y/o  
 50           (iv) la composición comprende una proteína de toxina en una cantidad de entre el 0,001 % y el 99 % en peso, preferentemente de entre el 0,5 % y el 98 % en peso, más preferentemente de entre el 1,0 % y el 95 % en peso.

13. Un proceso para la preparación de una composición pesticida de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende la mezcla de una cantidad de proteína de fusión producida de acuerdo con uno de los métodos descritos en las reivindicaciones 1 o 5-11 con uno o más vehículos, diluyentes, adyuvantes, conservantes, dispersantes, disolventes, agentes emulsionantes adecuados en una cantidad pesticida eficaz.

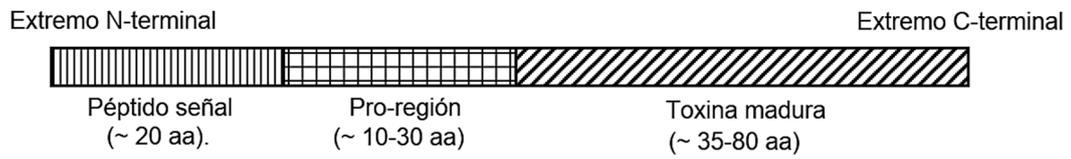
14. Un método para evitar o tratar una infección de una planta por plagas, que comprende la aplicación a la planta o a su lugar de crecimiento de una cantidad de proteína de fusión producida de acuerdo con uno de los métodos descritos en las reivindicaciones 1 o 5-11 o de una composición pesticida de acuerdo con la reivindicación 12; o la introducción en la planta de la construcción de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-4, o las reivindicaciones 5-11 cuando dependen de la reivindicación 3 o de la reivindicación 4, opcionalmente en donde la plaga es una babosa o un caracol, opcionalmente una babosa agreste.

15. Una composición de cebo molusquicida que comprende una proteína de fusión producida de acuerdo con uno de los métodos descritos en las reivindicaciones 1 o 5-11 y/o una composición pesticida de acuerdo con la

reivindicación 12.

16. Una planta transgénica o progenie de la misma que comprende una construcción de ácido nucleico como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 3-4, o las reivindicaciones 5-11 cuando dependen de la reivindicación 3 o la reivindicación 4, capaz de expresar una toxina con una mayor actividad biológica.

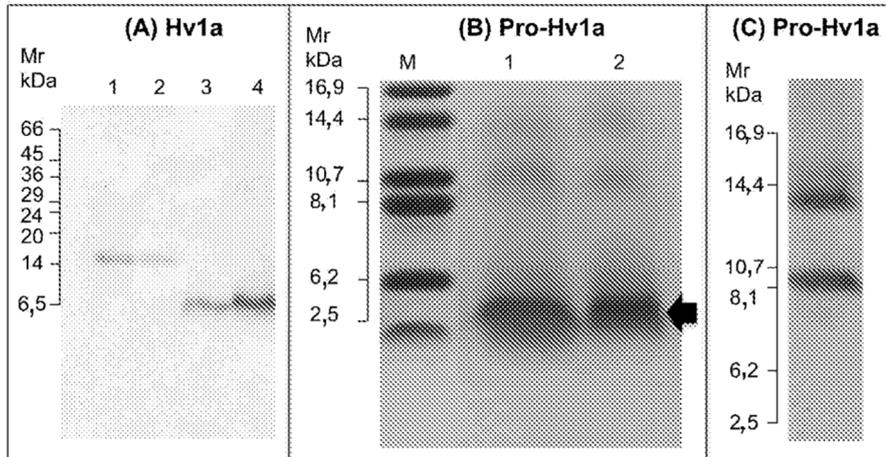
**A**



**B**

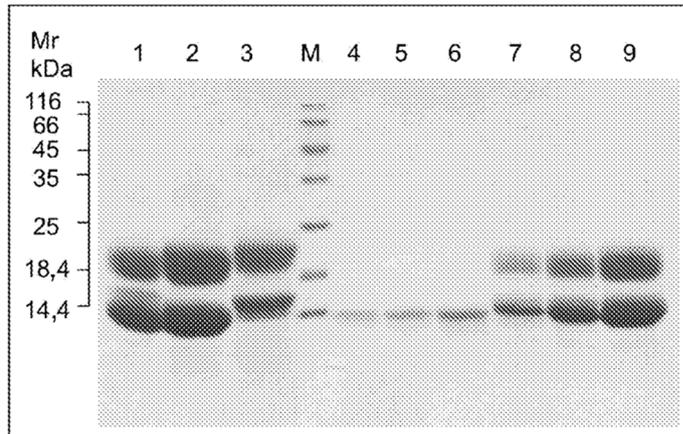
**EDTRADLQGGEAAEKVFRR**SPTCIPSGQPCPYNENCCSQSCTFKENENGNTVKRCD

**Figura 1: Esquema de la estructura génica de las toxinas que contienen pro-regiones**  
**(A)** Esquema de la estructura génica de las proteínas de toxinas que contienen pro-regiones.  
**(B)** Secuencia de la toxina de araña, Hv1a. La secuencia de aminoácidos en caja corresponde a la pro-región.



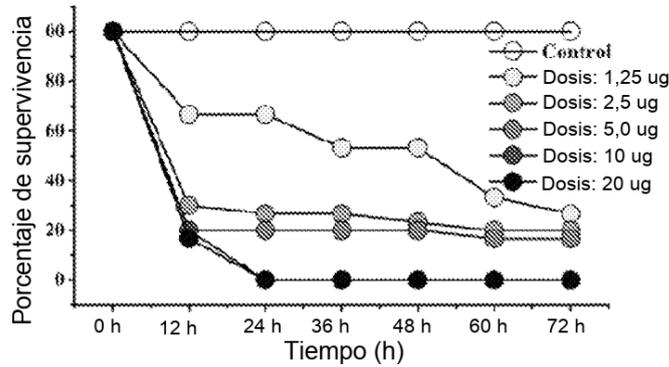
**Figura 2: Expresión y purificación de la toxina recombinante Hv1a y pro-Hv1a**

**(A)** Análisis en gel SDS-PAGE (20 % de acrilamida) que muestra la purificación de una toxina recombinante Hv1a marcada con Strep del sobrenadante de cultivo. Los carriles 1 y 2 son niveles de GNA (0,5 y 0,25  $\mu$ g, respectivamente) y los carriles 3 y 4 son fracciones de pico (10  $\mu$ l) tras la elución de la columna de estreptactina con destiobiotina 2,5 mM. **(B)** Análisis en gel Tris-tricina (15 % de acrilamida) de pro-Hv1a recombinante, los carriles 1 y 2 son fracciones de pico (10  $\mu$ l) tras la elución de una columna de afinidad de níquel con imidazol 0,2 M. La flecha representa el principal producto proteico que se predice que es pro-Hv1a, del cual se ha escindido la etiqueta de histidina. **(C)** Análisis de membrana Western de la muestra en (B) utilizando anticuerpos anti-His.

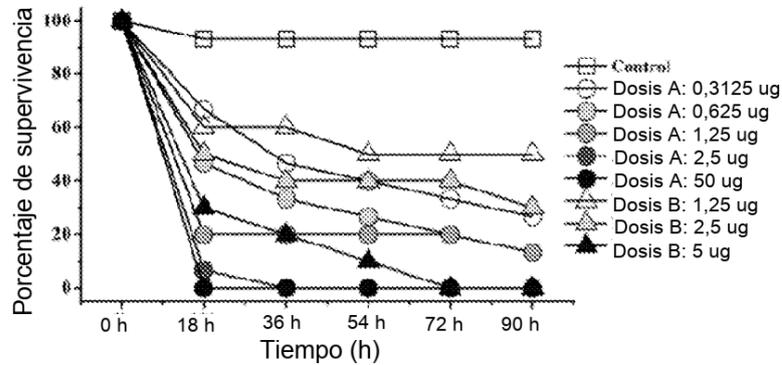


**Figura 3: Análisis en gel SDS-PAGE de muestras liofilizadas de pro-Hv1a/GNA, Hv1a/GNA y MODHv1a/GNA purificadas.** Análisis en SDS-PAGE (17,5 % de gel de acrilamida) de Hv1a recombinante purificada que contiene una proteína de fusión, teñida con gel para las proteínas totales con azul de Coomassie. Cargado de la siguiente manera: carril 1: pro-Hv1a/GNA; carril 2: Hv1a/GNA; carril 3: MODHv1a/GNA; carriles 4-6: niveles de GNA de 1, 2 y 4 µg, respectivamente; carriles 7-9: 12,5, 25 y 50 µg de pro-Hv1a/GNA liofilizada y purificada (para permitir la cuantificación del contenido de la proteína de fusión).

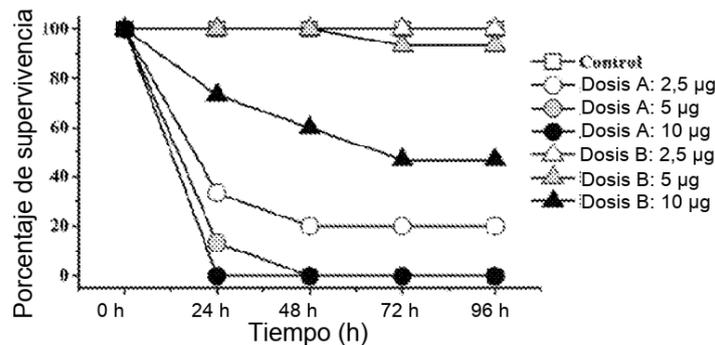
(A) Pro-Hv1a Larvas en 5° estado larvar



(B) Pro-Hv1a /GNA vs Hv1a/GNA Larvas en 3er-4° estado larvar

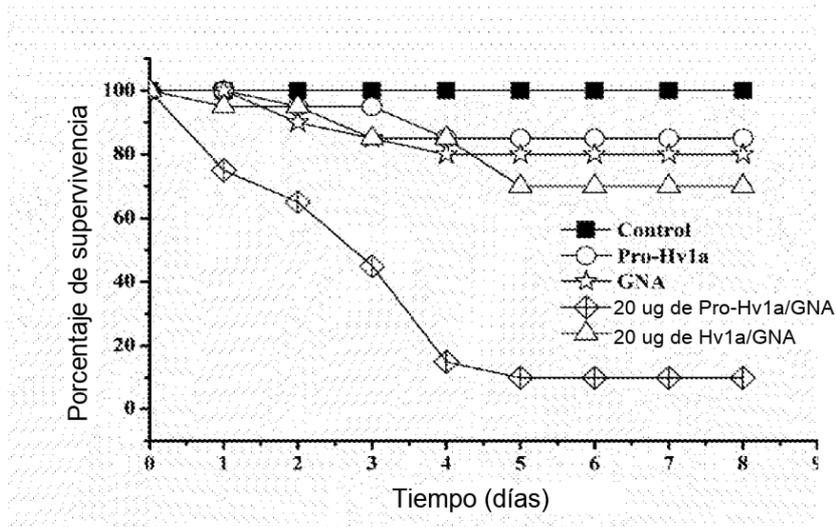


(C) Pro-Hv1a /GNA vs Hv1a/GNA Larvas en 5° estado larvar

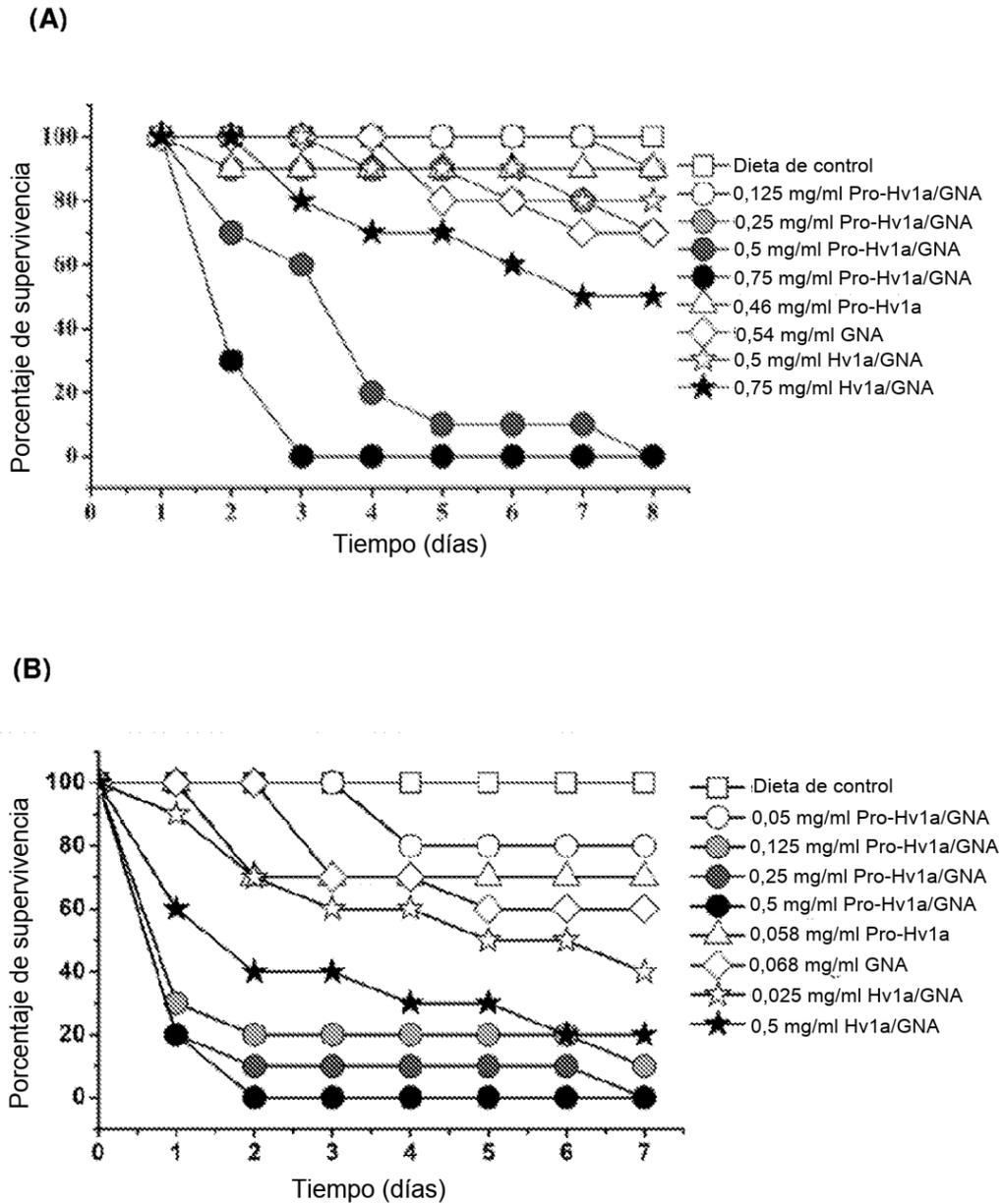


**Figura 4: Toxicidad de inyección de pro-Hv1a, pro-Hv1a/GNA y Hv1a/GNA recombinante en *Mamestra brassicae***

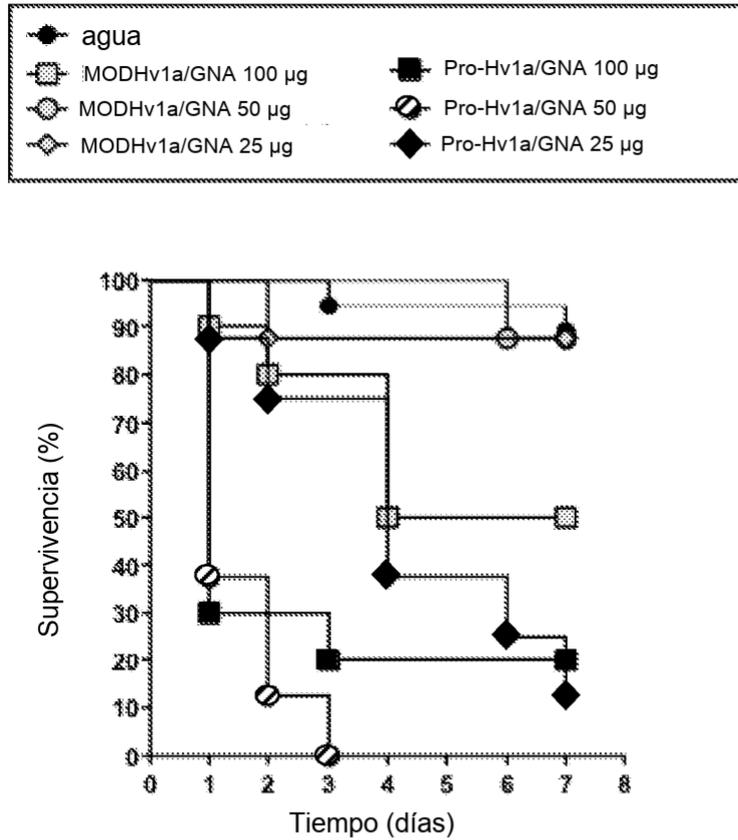
Porcentaje de supervivencia de larvas de *Mamestra brassicae* en 3er-5° estado larvario tras la inyección de diferentes dosis de pro-Hv1 a, pro-Hv1a/GNA o Hv1 a/GNA recombinante. **(A)** Porcentaje de supervivencia de larvas en 5° estado larvario tras la inyección de varias dosis de pro-Hva1. **(B)** Porcentaje de supervivencia de larvas en 3er-4° estado larvario tras la inyección de varias dosis de pro-Hv1a/GNA (Dosis A) o Hv1a/GNA (Dosis B). **(C)** Porcentaje de supervivencia de larvas en 5° estado larvario tras la inyección de varias dosis de pro-Hv1a/GNA (Dosis A) o Hv1a/GNA (Dosis B).



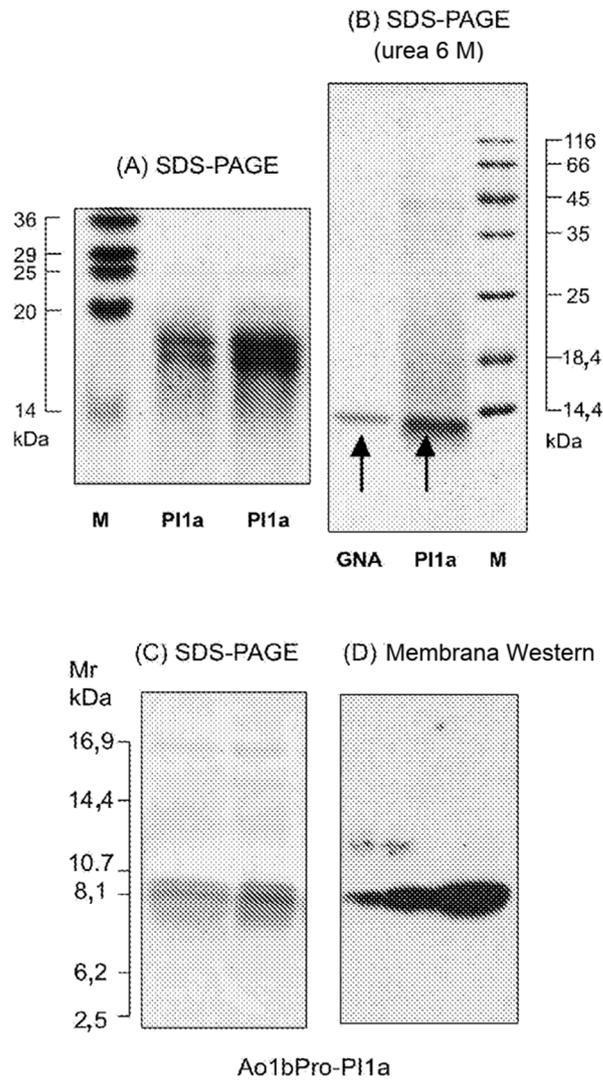
**Figura 5: Toxicidad de ingestión de pro-Hv1a, Hv1a/GNA, pro-Hv1a/GNA y GNA recombinante en *Mamestra brassicae*.** Porcentaje de supervivencia de larvas de *Mamestra brassicae* en 3<sup>er</sup> estado larvario tras la ingestión de una sola gota de 2  $\mu$ l que contiene 20  $\mu$ g de pro-Hv1 a, Hv1 a/GNA, pro-Hv1a/GNA o GNA purificada. Las larvas de control fueron alimentadas con una gota que no contenía ninguna proteína añadida (n=10 por tratamiento).



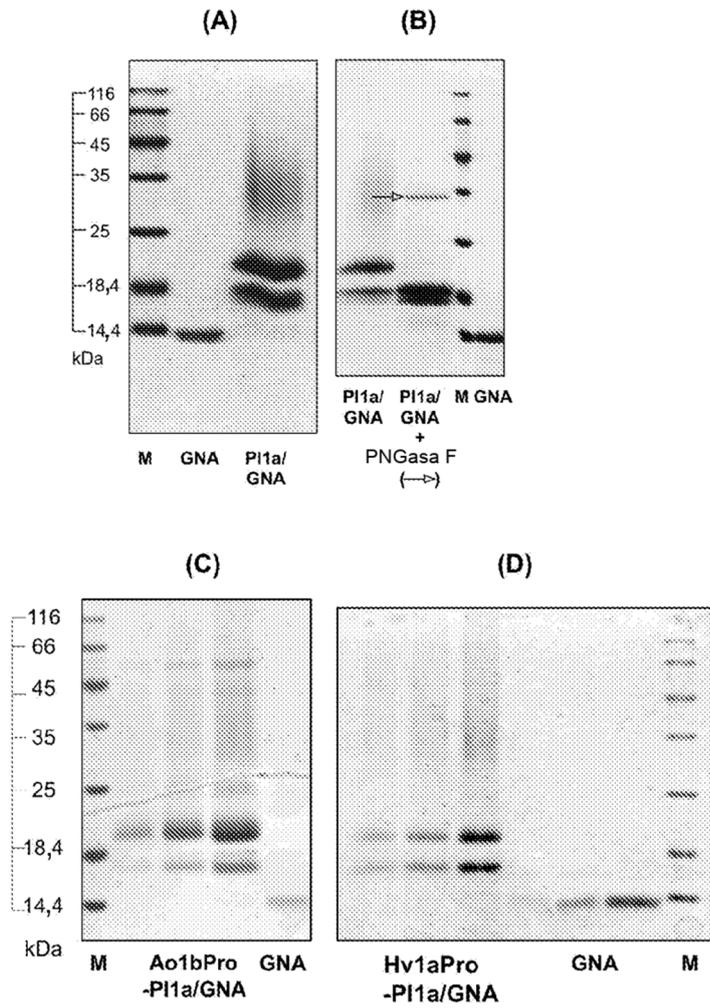
**Figura 6: Toxicidad de ingestión de pro-Hv1a, pro-Hv1a/GNA, Hv1a/GNA o GNA recombinante en *Acyrtosiphon pisum* y *Sitobion avenae***  
 Porcentaje de supervivencia de **(A)** *Acyrtosiphon pisum* (áfidos del guisante) y **(B)** *Sitobion avenae* (áfidos del cereal) con dietas artificiales que contienen 0,05-0,75 mg/ml de pro-Hv1a, pro-Hv1a/GNA, Hv1a/GNA o GNA recombinante purificada.



**Figura 7: Toxicidad de inyección de pro-Hv1a/GNA y Hv1a/GNA recombinante en *Deroceas reticulatum***  
 Porcentaje de supervivencia de *Deroceas reticulatum* (200 mg ± 40 mg) a los que se les inyectó 100, 50 o 25 µg de Hv1a/GNA o pro-Hv1a/GNA. n=18 para el tratamiento de control; n=10 para una dosis de 100 µg; y n=8 para una dosis de 50 y 25 µg.



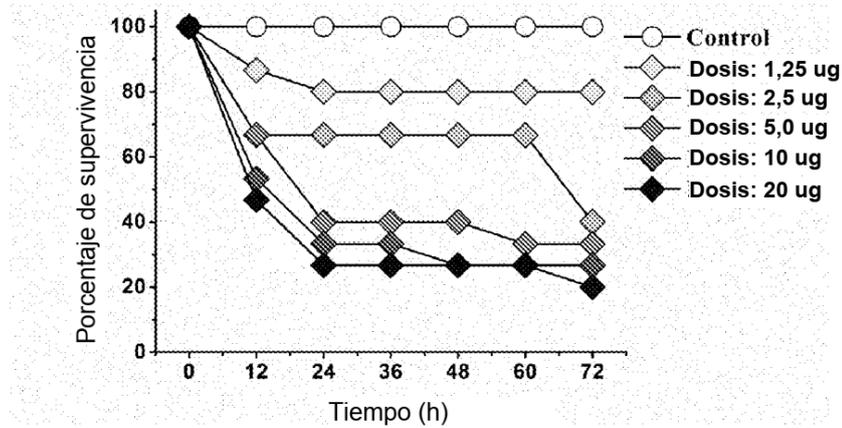
**Figura 8: Expresión y purificación de la toxina recombinante PI1a y Ao1bPro-PI1a**  
**(A)** Toxina PI1a derivada de una construcción que codifica la secuencia de toxina madura separada en SDS-PAGE "normal"; M indica marcador, las cargas de PI1a son de 5 y 10  $\mu\text{g}$ . **(B)** Toxina PI1a (5  $\mu\text{g}$ ) separada en SDS-PAGE después de la desnaturalización por urea 6 M. **(C)** Toxina PI1a recombinante derivada de una construcción que contiene la pro-región designada Ao1b en SDS-PAGE, las cargas de Ao1bPro-PI1a son de 2,5  $\mu\text{g}$ . **(D)** Inmunoelctrotransferencia de Ao1bPro-PI1a purificada (25, 50 y 100 ng) utilizando anticuerpos anti-His.



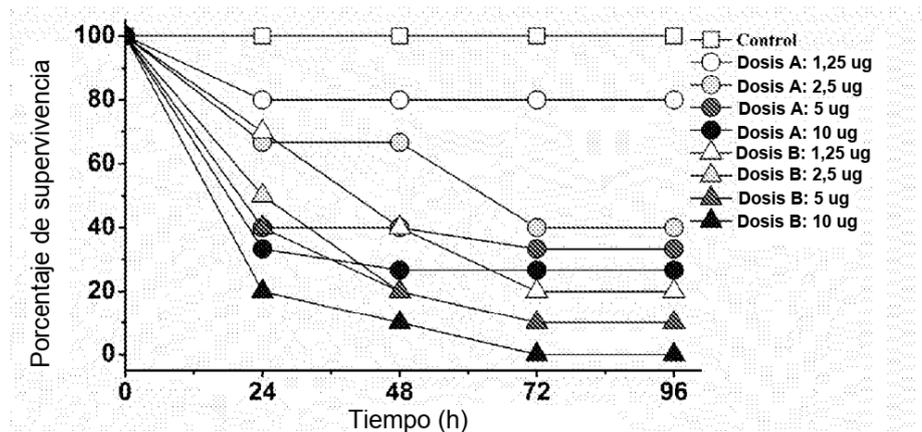
**Figura 9: Caracterización de las proteínas de fusión PI1a/GNA recombinantes purificadas por SDS-PAGE**

(A) Análisis por SDS-PAGE de la proteína de fusión PI1a/GNA (10 µg) y nivel de GNA (5 µg). (B) Desglicosilación de la proteína de fusión PI1a/GNA utilizando PNGasa F (banda indicada por la punta de flecha abierta), nivel de GNA (5 µg). (C) Análisis por SDS-PAGE de Ao1bPro-PI1a/GNA (1, 2 y 4 µg), nivel de GNA (5 µg). (D) Análisis por SDS-PAGE de Hv1aPro-PI1a/GNA (1, 2 y 4 µg), niveles de GNA (1, 2 y 4 µg).

**(A) Inyección de PI1a**



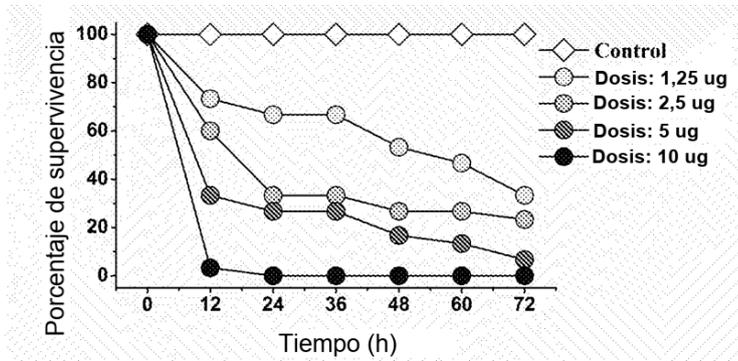
**(B) Inyección de PI1a y Ao1bPro-PI1a - Dosis A = PI1a; Dosis B = Ao1bPro-PI1a**



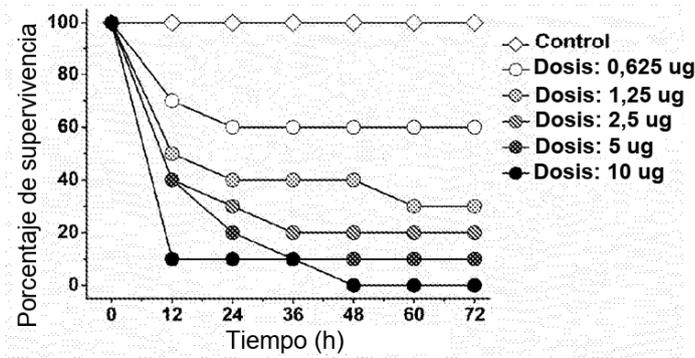
**Figura 10: Toxicidad de inyección de PI1a y Ao1bPro-PI1a recombinantes en *Mamestra brassicae***

**(A)** Porcentaje de supervivencia de larvas de *Mamestra brassicae* en 5º estado larvario tras la inyección de diferentes dosis de PI1a recombinante purificada. **(B)** Porcentaje de supervivencia de larvas de *Mamestra brassicae* en 5º estado larvario tras la inyección de diferentes dosis de PI1a recombinante purificada (Dosis A) o Ao1bPro-PI1a (Dosis B).

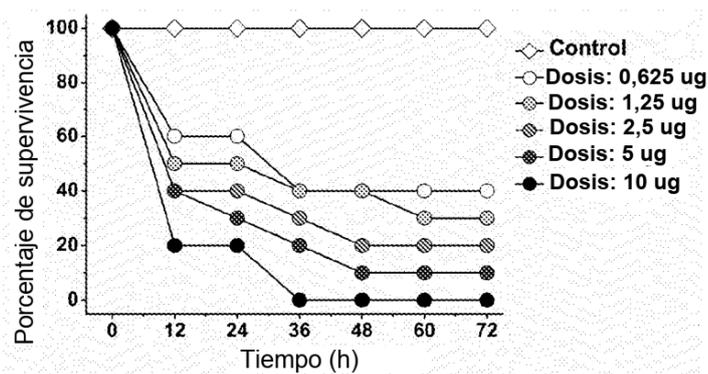
(A) PI1a/GNA



(B) Ao1b-ProPI1a/GNA



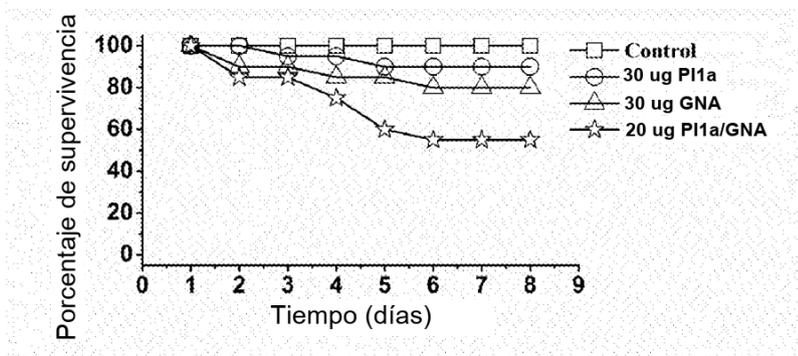
(C) Pro-Hv1aPI1a/GNA



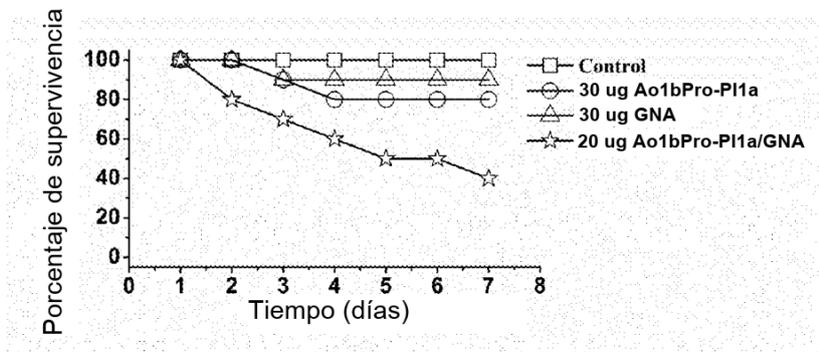
**Figura 11: Toxicidad de inyección de PI1a/GNA, Ao1bPro-PI1a/GNA y Pro-HV1a-PI1a/GNA recombinantes en *Mamestra brassicae***

Porcentaje de supervivencia de larvas de *Mamestra brassicae* en 5º estado larvario tras la inyección de diferentes dosis de PI1a/GNA (A), Ao1b-ProPI1a/GNA (B) o Pro-Hv1a-PI1a/GNA (C) recombinante purificada. n=20 por tratamiento.

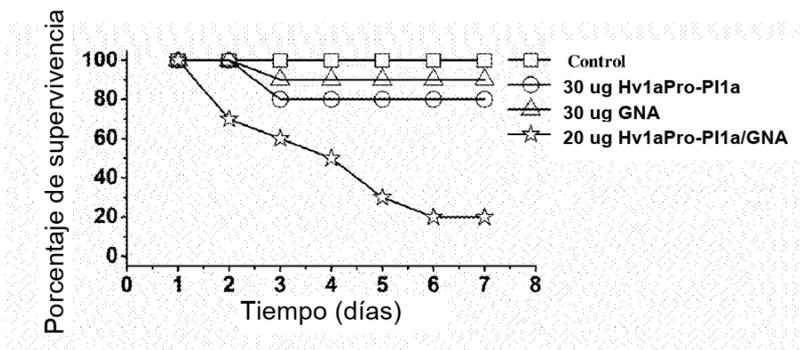
(A) Alimentación con gotas: PI1a/GNA



(B) Alimentación con gotas: Ao1bPro-PI1a/GNA



(C) Alimentación con gotas: Hv1aPro-PI1a/GNA



**Figura 12: Toxicidad de ingestión de PI1a/GNA, Ao1bPro-PI1a/GNA y Hv1aPro-PI1a/GNA recombinantes en *Mamestra brassicae***

Porcentaje de supervivencia de larvas de *Mamestra brassicae* en 3<sup>er</sup> estado larvario tras la ingestión de una sola gota de 2  $\mu$ l que contiene 20  $\mu$ g de proteínas de fusión PI1a/GNA (A), Ao1bPro-PI1a/GNA (B) o Hv1aPro-PI1a/GNA (C) purificadas. Los controles en todos los casos fueron de sacarosa solamente (sin proteína añadida); 30  $\mu$ g de toxina PI1a (forma madura o modificada) o GNA.