

PROTEÍNAS QUIMÉRICAS INSECTICIDAS NOVEDOSAS TÓXICAS O INHIBIDORAS DE PLAGAS DE LEPIDÓPTEROS

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5

La presente solicitud reivindica el beneficio de las solicitud provisional estadounidense n.º 62/064,989, presentada el 16 de octubre de 2014, que se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad.

10

INCORPORACIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

Se presenta un listado de secuencias en formato legible en computadora con la presente solicitud mediante presentación electrónica y se incorpora a la presente solicitud mediante esta referencia en su totalidad. El listado de secuencias contenido en el archivo creado el 23 de agosto de 2016 tiene el nombre P34230WO00_Seq_PCT_Art34.txt y tiene un tamaño de 898 229 bytes (medido en el sistema operativo MS-Windows®).

20

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere generalmente al campo de proteínas inhibidoras de insectos. Se describe en la presente solicitud una clase novedosa de proteínas quiméricas insecticidas que presentan actividad inhibidora de insectos contra plagas relevantes desde el punto de vista agrícola de semillas y plantas de cultivo. En particular, la clase descrita de proteínas presenta actividad insecticida contra el orden de Lepidópteros de plagas de insectos. Se proporcionan plantas, partes de plantas y semillas que contienen la molécula de ácido nucleico que codifica una o más de las proteínas de toxina descritas.

30

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Mejorar el rendimiento de cultivo de plantas significativas desde el punto de vista agrícola, las cuales incluyen, entre otras, maíz, soja, caña de azúcar, arroz, trigo,

verduras y algodón, se ha vuelto cada vez más importante. Además de la necesidad de cultivar productos agrícolas para alimentar, vestir y proporcionar energía a una población humana creciente, se predice que los efectos relacionados con el clima y la presión de la población creciente para usar la tierra para fines diferentes de las prácticas agrícolas reducirán la cantidad de tierra disponible para el cultivo. Estos factores han llevado a pronósticos negativos respecto a la seguridad del alimento, particularmente en ausencia de mejoras importantes en la biotecnología vegetal y las prácticas agronómicas. A la vista de estas presiones, las mejoras sostenibles desde el punto de vista ambiental en tecnología, técnicas agrícolas y el manejo de plagas son herramientas vitales para expandir la producción de cultivos en la cantidad limitada de tierra arable disponible para el cultivo.

Los insectos, particularmente los insectos del orden Lepidoptera, se consideran una causa principal de daño a los campos de cultivo, lo cual reduce el rendimiento de cultivo en las áreas infestadas. Las especies de plagas de lepidópteros que tienen un efecto negativo sobre la agricultura incluyen, de modo no taxativo, cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), gusano soldado (*Spodoptera exigua*), gusano de las crucíferas (*Mamestra configurata*), gusano cortador grasiento (*Agrotis ipsilon*), gusano falso medidor (*Trichoplusia ni*), lagarta verde (*Chrysodeixis includens*), oruga de las leguminosas (*Anticarsia gemmatilis*), gusano verde de la soja (*Hypena scabra*), gusano bellotero (*Heliothis virescens*), gusano trozador (*Agrotis subterranea*), oruga militar verdadera (*Pseudaletia unipuncta*), gusano cortador pálido del oeste (*Agrotis orthogonia*), taladro del maíz (*Ostrinia nubilalis*), gusano de la naranja navel (*Amyelois transitella*), gusano de la raíz del maíz (*Crambus caliginosellus*), gusano tejedor del césped (*Herpetogramma licarsisalis*), palomilla del capítulo (*Homoeosoma electellum*), gusano perforador del brote (*Elasmopalpus lignosellus*), polilla del manzano (*Cydia pomonella*), polilla de la uva (*Endopiza viteana*), polilla oriental del duraznero (*Grapholita molesta*), polilla de la yema del girasol (*Suleima helianthana*), palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*), gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*), taladrador purpura del arroz (*Sesamia inferens*), polilla gitana (*Lymantria dispar*), gusano medidor de la hoja del algodón (*Alabama argillacea*), enrollador de hojas frutales (*Archips argyrospila*), arrollador de los brotes (*Archips rosana*), barrenador del arroz o barrenador del tallo del arroz

(*Chilo suppressalis*), enrollador de las hojas de arroz (*Cnaphalocrocis medinalis*), gusano de la raíz del maíz (*Crambus caliginosellus*), oruga del césped (*Crambus teterrellus*), barrenador del maíz (*Diatraea grandiosella*), barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis*), oruga espinosa (*Earias insulana*), gusano moteado (*Earias vittella*), gusano cogollero (*Helicoverpa armigera*), gusano elotero, gusano del fruto o gusano de algodón (*Helicoverpa zea*), gusano tejedor del césped (*Herpetogramma licarsisalis*), polilla del racimo de la vid (*Lobesia botrana*), minador de hojas de los cítricos (*Phyllocnistis citrella*), blanca de la col (*Pieris brassicae*), mariposa de la col o blanquita de la col (*Pieris rapae*), gusano gris del tabaco o gusano defoliador (*Spodoptera litura*) y polilla de tomate (*Tuta absoluta*).

Históricamente, la aplicación intensiva de insecticidas químicos sintéticos era considerada como un agente de control de plagas en la agricultura. Las preocupaciones por el medioambiente y la salud humana, además de los problemas emergentes de resistencia, estimularon la investigación y desarrollo de pesticidas biológicos. Este esfuerzo de investigación llevó al descubrimiento y uso progresivo de varias especies microbianas entomopatógenas, inclusive bacterias.

El paradigma de control biológico cambió cuando se descubrió el potencial de bacterias entomopatógenas, especialmente las bacterias que pertenecen al género *Bacillus*, y se desarrolló como un agente de control de plagas biológicas. Se han usado cepas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) como fuente de proteínas insecticidas, dado que se descubrió que las cepas de *Bt* presentan una toxicidad elevada contra insectos específicos. Se conoce que las cepas de *Bt* producen delta-endotoxinas que están localizadas dentro de cuerpos de inclusión cristalinos paraesporales al comienzo de la esporulación y durante la fase de crecimiento estacionario (por ejemplo, proteínas Cry), y también se conoce que producen proteínas insecticidas secretadas. Cuando son ingeridas por un insecto susceptible, las delta-endotoxinas, así como las toxinas secretadas, ejercen sus efectos en la superficie del epitelio del intestino medio y rompen la membrana celular, lo cual lleva a la ruptura y muerte de la célula. Los genes que codifican proteínas insecticidas también se han identificado en especies bacterianas que no son *Bt*, inclusive otros *Bacillus* y una diversidad de otras especies bacterianas, tales como *Brevibacillus laterosporus*, *Lysinibacillus sphaericus* ("Ls", conocido anteriormente como *Bacillus*

sphaericus) y *Paenibacillus popilliae*.

Las toxinas de proteínas insecticidas solubles secretadas y cristalinas son altamente específicas para sus hospedadores y han obtenido una aceptación mundial como alternativas a los insecticidas químicos. Por ejemplo, las proteínas de toxinas insecticidas se han empleado en varias aplicaciones agrícolas para proteger plantas importantes desde el punto de vista agrícola de infestaciones de insectos, disminuir la necesidad de aplicaciones de pesticidas químicos y aumentar los rendimientos. Las proteínas de toxinas insecticidas se usan para controlar plagas relevantes desde el punto de vista agrícola mediante métodos mecánicos, tal como aspersión para dispersar formulaciones microbianas que contienen varias cepas bacterianas en la superficie de plantas, y mediante el uso de técnicas de transformación genética para producir plantas y semillas transgénicas que expresan proteínas de toxinas insecticidas.

El uso de plantas transgénicas que expresan proteínas insecticidas se ha adoptado a nivel mundial. Por ejemplo, en 2012, 26,1 millones de hectáreas se plantaron con cultivos transgénicos que expresan toxinas de *Bt* (James, C., Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012. ISAAA Brief No. 44). El uso mundial de cultivos transgénicos protegidos contra insectos y la cantidad limitada de proteínas insecticidas usadas en esos cultivos ha creado una presión para seleccionar alelos insecticidas existentes que impartan resistencia a las proteínas insecticidas utilizadas actualmente.

El desarrollo de resistencia en las plagas objetivo a las proteínas insecticidas crea una necesidad continua para descubrir y desarrollar nuevas formas de proteínas insecticidas que sean útiles en el manejo del aumento en la resistencia a insecticidas de cultivos transgénicos que expresan proteínas insecticidas. Las proteínas insecticidas nuevas con eficacia mejorada y que presenten un control sobre un amplio espectro de especies de insecto susceptibles reducirá la cantidad de insectos sobrevivientes que puedan desarrollar alelos de resistencia. Además, el uso en una planta de dos o más proteínas insecticidas transgénicas tóxicas para la misma plaga de insectos y que presente modos diferentes de acción reduce la probabilidad de resistencia en cualquier especie de insecto objetivo individual.

- Por consiguiente, existe una necesidad crucial para identificar proteínas insecticidas adicionales con propiedades insecticidas mejoradas, tales como eficacia contra un amplio espectro de especie de plagas de insectos objetivo y modos diferentes de acción en comparación con las toxinas empleadas actualmente en prácticas agrícolas. Para satisfacer esta necesidad, la presente invención describe proteínas quiméricas insecticidas Cry1 novedosas que presentan actividad contra especies de plagas de lepidópteros objetivo importantes.
- Se conoce en la técnica que los miembros de la familia de proteínas cristalinas Cry1 presentan bioactividad contra las plagas de lepidópteros. El precursor de proteína cristalinas Cry 1 consiste en dos segmentos de tamaño aproximadamente igual. La parte del extremo carboxi de la proteína precursora, conocida como segmento de protoxina, estabiliza la formación de cristales y no presenta actividad insecticida. La mitad del extremo amino de la proteína precursora comprende el segmento de toxina de la proteína Cry1 y, basándose en la alineación de las secuencias conservadas o sustancialmente conservadas dentro de los miembros de la familia Cry1, puede subdividirse en tres dominios estructurales, el dominio I, el dominio II y el dominio III. El dominio I comprende alrededor de del primer tercio del segmento de toxina activa y se demostró que es esencial para la formación de canales. Los dominios II y III han sido ambos implicados en la unión al receptor y la especificidad de especie de insecto, dependiendo del insecto y de la proteína insecticida que esté siendo examinada.
- La posibilidad de crear de manera arbitraria una proteína quimérica con propiedades mejoradas a partir de la distribución de estructuras de dominio de las numerosas proteínas insecticidas naturales conocidas en la técnica es remota. Esto es el resultado de la naturaleza compleja de la estructura de la proteína, la oligomerización y la activación (inclusive el procesamiento proteolítico correcto del precursor quimérico, si se expresa en dicha forma) necesarias para liberar un segmento de proteína insecticida. Pueden crearse toxinas insecticidas quiméricas funcionales únicamente mediante la selección cuidadosa de protoxinas y objetivos específicos dentro de cada proteína original para la creación de una estructura quimérica, donde estas presentan actividad insecticida mejorada en comparación

con las proteínas originales de las que derivan las quimeras. Se conoce en la técnica que el reensamblaje de los dominios de toxina y protoxina I, II y III de dos o más toxinas que sea diferentes entre sí, da como resultado la producción de proteínas que presentan formación cristalina fallida o la falta total de cualquier actividad insecticida detectable dirigida a una especie de plaga de insectos objetivo preferida. Solamente mediante ensayo y error se diseñan quimeras insecticidas eficaces, e incluso así el experto en la técnica no está seguro de que logrará una quimera que presente una actividad insecticida que sea equivalente o esté mejorada en comparación con cualquier proteína de toxina original individual de la cual los puedan haber derivado los dominios de toxina o protoxina constituyentes. Por ejemplo, la bibliografía posee numerosos ejemplos de la producción o ensamblaje de proteínas quiméricas a partir de dos o más precursores de proteína cristalina. Ver, por ejemplo, Jacqueline S. Knight, et ál. "A Strategy for Shuffling Numerous *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein Domains." *J. Economic Entomology*, 97 (6) (2004): 1805-1813; Bosch, et ál. (patente estadounidense n.º 6,204,246); Malvar y Gilmer (patente estadounidense n.º 6,017,534). En cada uno de estos ejemplos, muchas de las quimeras resultantes no presentaron propiedades insecticidas o cristalinas que fueran equivalentes o mejoradas en comparación con las proteínas precursoras de la cuales derivaron los componentes de las quimeras.

COMPENDIO DE LA INVENCION

Se proporcionan moléculas de ácido nucleico recombinante que codifican proteínas quiméricas insecticidas tóxicas para especies de lepidópteros en plagas vegetales. Cada una de las proteínas quiméricas insecticidas puede usarse sola o en combinación con las otras y con otras proteínas insecticidas y agentes inhibidores de insectos en formulaciones e *in planta*; lo cual proporciona proteínas insecticidas y químicas insecticidas que se usan actualmente en sistemas agrícolas.

En determinadas modalidades, se describe en la presente una proteína quimérica insecticida que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 21, 10, 28, 7, 4, 13, 16, 19, 23, 25, 30, 33, 36, 39, 41, 43, 45, 47, 50, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 o 111. Esta proteína quimérica

insecticida presenta actividad inhibidora contra una especie de insectos del orden Lepidoptera, tales como, de modo no taxativo, *Anticarsia gemmatalis*, *Diatraea saccharalis*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Helicoverpa zea*, *Heliiothis virescens*, *Chrysodeixis includens*, *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura*, *Pectinophora gossypiella*, *Diatraea grandiosella*, *Earias vitella*, *Helicoverpa gelotopen* y *Rachiplusia nu*.

En otra modalidad, se describe un polinucleótido que codifica una proteína quimérica insecticida, donde el polinucleótido está unido de manera operativa a un promotor heterólogo y la proteína quimérica insecticida comprende la secuencia de aminoácidos tal como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 21, 10, 28, 7, 4, 13, 16, 19, 23, 25, 30, 33, 36, 39, 41, 43, 45, 47, 50, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 o 111. También se contempla un polinucleótido que codifica una proteína quimérica insecticida, donde el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que, opcionalmente, se hibrida en condiciones rigurosas con el complemento inverso de la secuencia de polinucleótidos tal como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 27, 29, 31, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 49, 51, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129 o 130; o codifica la proteína quimérica insecticida que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 21, 10, 28, 7, 4, 13, 16, 19, 23, 25, 30, 33, 36, 39, 41, 43, 45, 47, 50, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 o 111.

En otras modalidades, se describe en la presente una proteína quimérica insecticida que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 27, 29, 31, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 49, 51, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127,

128, 129 o 130, donde la célula hospedadora se selecciona del grupo que consiste en una célula hospedadora bacteriana o una célula hospedadora vegetal. Los hospedadores bacterianos contemplados incluyen *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, y *Erwinia*; y donde la especie de *Bacillus* es *Bacillus cereus* o *Bacillus thuringiensis*, dicho *Brevibacillus* es *Brevibacillus laterosperous*, y dicha *Escherichia* es *Escherichia coli*. Las células vegetales contempladas incluyen monocotiledóneas y dicotiledóneas.

Otras modalidades descritas en la presente incluyen composiciones inhibidoras de insectos que comprenden una secuencia de aminoácidos tal como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 21, 10, 28, 7, 4, 13, 16, 19, 23, 25, 30, 33, 36, 39, 41, 43, 45, 47, 50, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 o 111. En determinadas modalidades, la composición inhibidor de insectos comprende además al menos un agente inhibidor de insectos diferente a la proteína quimérica insecticida. Los agentes inhibidores de insectos diferentes de la proteína quimérica insecticida contemplados incluyen una proteína inhibidora de insectos, una molécula de ARNdc inhibidora de insectos y una química inhibidora de insectos. Estos agentes inhibidores de insectos diferentes de la proteína quimérica insecticida pueden presentar actividad contra una o más especies de plaga de los orden Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera, Homoptera y Thysanoptera.

En aun otras modalidades, se describe en la presente una semilla que comprende una cantidad eficaz inhibidora de insectos de: una proteína quimérica insecticida que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 21, 10, 28, 7, 4, 13, 16, 19, 23, 25, 30, 33, 36, 39, 41, 43, 45, 47, 50, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 o 111; o un polinucleótido establecido en cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 27, 29, 31, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 49, 51, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129 o 130.

También se contemplan métodos para controlar una plagas de lepidópteros comprenden poner en contacto la plaga de lepidópteros con una cantidad inhibidora de una proteína quimérica insecticida de la invención.

- 5 En otra modalidad, se describen en la presente una célula vegetal, planta o parte de planta transgénica que comprende una proteína quimérica insecticida, donde: la proteína quimérica insecticida comprende cualquier secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 21, 10, 28, 7, 4, 13, 16, 19, 23, 25, 30, 33, 36, 39, 41, 43, 45, 47, 50, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 o 111; o la
- 10 proteína quimérica insecticida comprende una proteína que es: al menos 94 % idéntica a las SEQ ID NO:21, 10; al menos 93 % idéntica a la SEQ ID NO:28 al menos 87 % idéntica a la SEQ ID NO:7; al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO:4; al menos 91 % idéntica a la SEQ ID NO:13; al menos 64 % idéntica a la SEQ
- 15 ID NO:16; al menos 66 % idéntica a la SEQ ID NO:19; al menos 86 % idéntica a la SEQ ID NO:23; al menos 91 % idéntica a la SEQ ID NO:25; al menos 94 % idéntica a la SEQ ID NO:30; al menos 91 % idéntica a la SEQ ID NO:33; al menos 64 % idéntica a la SEQ ID NO:36; al menos 66 % idéntica a la SEQ ID NO:39; al menos 94 % idéntica a la SEQ ID NO:41; al menos 84 % idéntica a la SEQ ID NO:43; al
- 20 menos 93 % idéntica a la SEQ ID NO:45; al menos 94 % idéntica a la SEQ ID NO: 47; al menos 91 % idéntica a la SEQ ID NO:50; o al menos 93 % idéntica a la SEQ ID NO:53; o al menos 87 % idéntica a las SEQ ID NOs:85, 93, 105; o al menos 85 % idéntica a las SEQ ID NOs:55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79; o al menos 88 % idéntica a las SEQ ID NOs:91, 87, 89; o al menos 89 % idéntica a las
- 25 SEQ ID NOs:107, 111; o al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:97; al menos 91 % idéntica a la SEQ ID NO:109; o al menos 93 % idéntica a la SEQ ID NO:83; o al menos 94 % idéntica a las SEQ ID NOs:91 o 103; o al menos 95 % idéntica a las SEQ ID NOs:95, 101; o al menos 98 % idéntica a la SEQ ID NO:99. También se contemplan métodos para controlar una plagas de lepidópteros que comprende
- 30 exponer la plaga a esta célula vegetal, planta o parte de planta, donde dicha célula vegetal, planta o parte de planta expresa una cantidad inhibidora de lepidópteros de la proteína quimérica insecticida.

En otras modalidades de la presente, se proporcionan productos de materia prima

derivados de la célula vegetal, planta o parte de planta, donde el producto comprende una cantidad detectable de la proteína quimérica insecticida. Los productos de materia prima contemplados incluyen biomasa vegetal, aceite, alimento, pienso, harina, copos, salvado, hebras, vainas y semillas procesadas.

5

Otro método descrito en la presente es un método para producir una semilla que comprende una proteína quimérica insecticida, donde el método comprende: plantar al menos una semilla que comprende una proteína quimérica insecticida; cultivar plantas a partir de dicha semilla; y cosechar semillas de dichas plantas, donde
10 dichas semillas cosechadas comprenden la proteína quimérica insecticida.

También se contemplan en la presente moléculas de polinucleótidos recombinantes que codifican una proteína quimérica insecticida, que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 5, 6, 8,
15 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 27, 29, 31, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 49, 51, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129 o 130; y, opcionalmente, una secuencia de polinucleótidos que codifica un agente inhibidor de insectos distinto de
20 la proteína quimérica insecticida.

Otra molécula de ácido nucleico recombinante contemplada en la presente comprende un promotor heterólogo unido de manera operativa a un segmento de polinucleótido que codifica una proteína quimérica insecticida, donde: la proteína
25 quimérica insecticida comprende cualquier secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 21, 10, 28, 7, 4, 13, 16, 19, 23, 25, 30, 33, 36, 39, 41, 43, 45, 47, 50, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 o 111; o la proteína quimérica insecticida comprende una proteína que es: al menos 94% idéntica a las SEQ ID
30 NO:21, 10; al menos 93% idéntica a la SEQ ID NO:28 al menos 87% idéntica a la SEQ ID NO:7; al menos 90% de identidad con la SEQ ID NO:4; al menos 91% idéntica a la SEQ ID NO:13; al menos 64% idéntica a la SEQ ID NO:16; al menos 66% idéntica a la SEQ ID NO:19; al menos 86% idéntica a la SEQ ID NO:23; al menos 91% idéntica a la SEQ ID NO:25; al menos 94% idéntica a la SEQ ID NO:30;

- al menos 91% idéntica a la SEQ ID NO:33; al menos 64% idéntica a la SEQ ID NO:36; al menos 66% idéntica a la SEQ ID NO:39; al menos 94% idéntica a la SEQ ID NO:41; al menos 84% idéntica a la SEQ ID NO:43; al menos 93% idéntica a la SEQ ID NO:45; al menos 94% idéntica a la SEQ ID NO: 47; al menos 91 % idéntica a la SEQ ID NO:50; o al menos 93 % idéntica a la SEQ ID NO:53; o al menos 87 % idéntica a las SEQ ID NOS:85, 93, 105; o al menos 85 % idéntica a las SEQ ID NOS:55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79; o al menos 88 % idéntica a las SEQ ID NOS:91, 87, 89; o al menos 89 % idéntica a las SEQ ID NOS:107, 111; o al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:97; al menos 91 % idéntica a la SEQ ID NO:109; o al menos 93 % idéntica a la SEQ ID NO:83; o al menos 94 % idéntica a las SEQ ID NOS:91 o 103; o al menos 95 % idéntica a las SEQ ID NOS:95, 101; o al menos 98 % idéntica a la SEQ ID NO:99; o el segmento de polinucleótido se hibrida con un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos tal como se establece en cualquiera de las SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 27, 29, 31, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 49, 51, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129 o 130.
- Otras modalidades, características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada, ejemplos y reivindicaciones que siguen más adelante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

- La SEQ ID NO: 1 es una secuencia de ADN recombinante que codifica TIC1100 usada para la expresión en una célula bacteriana.
- SEQ ID NO: 2 es una secuencia de ADN sintética que codifica TIC1100 para la expresión en una célula vegetal.
- SEQ ID NO: 3 es una secuencia de ADN sintética que codifica TIC1100 para la expresión en una célula vegetal.

SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos de TIC1100.

SEQ ID NO: 5 es una secuencia de ADN recombinante que codifica TIC860 usada para la expresión en una célula bacteriana.

5

SEQ ID NO: 6 es una secuencia de ADN sintética que codifica TIC860 para la expresión en una célula vegetal.

SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos de TIC860.

10

SEQ ID NO: 8 es una secuencia de ADN recombinante que codifica TIC867 usada para la expresión en una célula bacteriana.

SEQ ID NO: 9 es una secuencia de ADN sintética que codifica TIC867 para la expresión en una célula vegetal.

15

SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácidos de TIC867.

SEQ ID NO: 11 es una secuencia de ADN recombinante que codifica TIC867_20 usada para la expresión en una célula bacteriana.

20

SEQ ID NO: 12 es una secuencia de ADN sintética que codifica TIC867_20 para la expresión en una célula vegetal.

SEQ ID NO: 13 es la secuencia de aminoácidos de TIC867_20.

25

SEQ ID NO: 14 es una secuencia de ADN recombinante que codifica TIC867_21 usada para la expresión en una célula bacteriana.

SEQ ID NO: 15 es una secuencia de ADN sintética que codifica TIC867_21 para la expresión en una célula vegetal.

30

SEQ ID NO: 16 es la secuencia de aminoácidos de TIC867_21.

SEQ ID NO: 17 es una secuencia de ADN recombinante que codifica TIC867_22 usada para la expresión en una célula bacteriana.

5 SEQ ID NO: 18 es una secuencia de ADN sintética que codifica TIC867_22 para la expresión en una célula vegetal.

SEQ ID NO: 19 es la secuencia de aminoácidos de TIC867_22.

10 SEQ ID NO: 20 es una secuencia de ADN sintética que codifica TIC867_23 para la expresión en la célula vegetal.

SEQ ID NO: 21 es la secuencia de aminoácidos de TIC867_23.

15 SEQ ID NO: 22 es una secuencia de ADN sintética que codifica TIC867_24 para la expresión en una célula vegetal.

SEQ ID NO: 23 es la secuencia de aminoácidos de TIC867_24.

20 SEQ ID NO: 24 es una secuencia de ADN sintética que codifica TIC867_24 para la expresión en una célula vegetal.

SEQ ID NO: 25 es la secuencia de aminoácidos de TIC867_25.

25 SEQ ID NO: 26 es una secuencia de ADN recombinante que codifica TIC868 usada para la expresión en una célula bacteriana.

SEQ ID NO: 27 es una secuencia de ADN sintética que codifica TIC868 para la expresión en una célula vegetal.

30 SEQ ID NO: 28 es la secuencia de aminoácidos de TIC868.

SEQ ID NO: 29 es una secuencia de ADN sintética que codifica TIC868_9 para la expresión en una célula vegetal.

SEQ ID NO: 30 es la secuencia de aminoácidos de TIC868_9.

SEQ ID NO: 31 es una secuencia de ADN recombinante que codifica TIC868_10 usada para la expresión en una célula bacteriana.

5

SEQ ID NO: 32 es una secuencia de ADN sintética para la expresión en la célula vegetal que codifica la variante de TIC868, TIC868_10.

SEQ ID NO: 33 es la secuencia de aminoácidos de TIC868_10.

10

SEQ ID NO: 34 es una secuencia de ADN recombinante que codifica TIC868_11 usada para la expresión en una célula bacteriana.

SEQ ID NO: 35 es una secuencia de ADN sintética que codifica TIC868_11 para la expresión en una célula vegetal.

15

SEQ ID NO: 36 es la secuencia de aminoácidos de TIC868_11.

SEQ ID NO: 37 es una secuencia de ADN recombinante que codifica TIC868_12 usada para la expresión en una célula bacteriana.

20

SEQ ID NO: 38 es una secuencia de ADN sintética que codifica TIC868_12 para la expresión en la célula vegetal.

SEQ ID NO: 39 es la secuencia de aminoácidos de TIC868_12.

25

SEQ ID NO: 40 es una secuencia de ADN sintética que codifica TIC868_13 para la expresión en la célula vegetal.

SEQ ID NO: 41 es la secuencia de aminoácidos de TIC868_13.

30

SEQ ID NO: 42 es una secuencia de ADN sintética que codifica TIC868_14 para la expresión en una célula vegetal.

SEQ ID NO: 43 es la secuencia de aminoácidos de TIC868_14.

SEQ ID NO: 44 es una secuencia de ADN sintética que codifica TIC868_15 para la expresión en una célula vegetal.

5

SEQ ID NO: 45 es la secuencia de aminoácidos de TIC868_15.

SEQ ID NO: 46 es una secuencia de ADN sintética que codifica TIC868_29 para la expresión en una célula vegetal.

10

SEQ ID NO: 47 es la secuencia de aminoácidos de TIC868_29.

SEQ ID NO: 48 es una secuencia de ADN recombinante que codifica TIC869 usada para la expresión en una célula bacteriana.

15

SEQ ID NO: 49 es una secuencia de ADN sintética que codifica TIC869 para la expresión en una célula vegetal.

SEQ ID NO: 50 es la secuencia de aminoácidos de TIC869.

20

SEQ ID NO: 51 es una secuencia de ADN recombinante que codifica TIC836 usada para la expresión en una célula bacteriana.

SEQ ID NO: 52 es una secuencia de ADN sintética que codifica TIC836 para la expresión en una célula vegetal.

25

SEQ ID NO: 53 es la secuencia de aminoácidos de TIC836.

SEQ ID NO: 54 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC713.

30

SEQ ID NO: 55 es la secuencia de aminoácidos de TIC713 traducida a partir del marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 54.

SEQ ID NO: 56 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC843.

5 SEQ ID NO: 57 es la secuencia de aminoácidos de TIC843 traducida a partir del marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 56.

SEQ ID NO: 58 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC862.

10 SEQ ID NO: 59 es la secuencia de aminoácidos de TIC862 traducida a partir del marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 58.

SEQ ID NO: 60 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC1099.

15

SEQ ID NO: 61 es la secuencia de aminoácidos de TIC1099 traducida a partir del marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 60.

20 SEQ ID NO: 62 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC1099-T507E.

SEQ ID NO: 63 es la secuencia de aminoácidos de TIC1099-T507E traducida a partir del marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 62.

25 SEQ ID NO: 64 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC1099-R522K.

SEQ ID NO: 65 es la secuencia de aminoácidos de TIC1099-R522K traducida a partir del marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 64.

30

SEQ ID NO: 66 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC1099-K490S.

SEQ ID NO: 67 es la secuencia de aminoácidos de TIC1099-K490S traducida a

partir del marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 66.

SEQ ID NO: 68 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC1099-T562R.

5

SEQ ID NO: 69 es la secuencia de aminoácidos de TIC1099-T562R traducida a partir del marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 68.

10 SEQ ID NO: 70 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC1099-S553R.

SEQ ID NO: 71 es la secuencia de aminoácidos de TIC1099-S553R traducida a partir del marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 70.

15 SEQ ID NO: 72 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC1099-G498D.

SEQ ID NO: 73 es la secuencia de aminoácidos de TIC1099-G498D traducida a partir del marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 72.

20

SEQ ID NO: 74 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC1099-K490A.

25 SEQ ID NO: 75 es la secuencia de aminoácidos de TIC1099-K490A traducida a partir del marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 74.

SEQ ID NO: 76 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC1099-E564A.

30 SEQ ID NO: 77 es la secuencia de aminoácidos de TIC1099-E564A traducida a partir del marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 76.

SEQ ID NO: 78 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC1103.

SEQ ID NO: 79 es la secuencia de aminoácidos de TIC1103 traducida a partir del marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 78.

- 5 SEQ ID NO: 80 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC1101.

SEQ ID NO: 81 es la secuencia de aminoácidos de TIC1101 traducida a partir del marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 80.

10

SEQ ID NO: 82 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC845.

- 15 SEQ ID NO: 83 es la secuencia de aminoácidos de TIC845 traducida a partir del marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 82.

SEQ ID NO: 84 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC846.

- 20 SEQ ID NO: 85 es la secuencia de aminoácidos de TIC846 traducida a partir del marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 84.

SEQ ID NO: 86 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC858.

25

SEQ ID NO: 87 es la secuencia de aminoácidos de TIC858 traducida a partir del marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 86.

- 30 SEQ ID NO: 88 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC865.

SEQ ID NO: 89 es la secuencia de aminoácidos de TIC865 traducida a partir del marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 88.

SEQ ID NO: 90 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC866.

5 SEQ ID NO: 91 es la secuencia de aminoácidos de TIC866 traducida a partir del marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 90.

SEQ ID NO: 92 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC838.

10 SEQ ID NO: 93 es la secuencia de aminoácidos de TIC838 traducida a partir del marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 92.

SEQ ID NO: 94 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC839.

15

SEQ ID NO: 95 es la secuencia de aminoácidos de TIC839 traducida a partir del marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 94.

20 SEQ ID NO: 96 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC841.

SEQ ID NO: 97 es la secuencia de aminoácidos de TIC841 traducida a partir del marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 96.

25 SEQ ID NO: 98 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC842.

SEQ ID NO: 99 es la secuencia de aminoácidos de TIC842 traducida a partir del marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 98.

30

SEQ ID NO: 100 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC850.

SEQ ID NO: 101 es la secuencia de aminoácidos de TIC850 traducida a partir del

marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 100.

SEQ ID NO: 102 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC859.

5

SEQ ID NO: 103 es la secuencia de aminoácidos de TIC859 traducida a partir del marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 102.

SEQ ID NO: 104 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC861.

10

SEQ ID NO: 105 es la secuencia de aminoácidos de TIC861 traducida a partir del marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 104.

SEQ ID NO: 106 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC848.

15

SEQ ID NO: 107 es la secuencia de aminoácidos de TIC848 traducida a partir del marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 106.

20

SEQ ID NO: 108 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC849.

SEQ ID NO: 109 es la secuencia de aminoácidos de TIC849 traducida a partir del marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 108.

25

SEQ ID NO: 110 es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos quimérica de TIC847.

SEQ ID NO: 111 es la secuencia de aminoácidos de TIC847 traducida a partir del marco de lectura abierto que se establece en la SEQ ID NO: 110.

30

SEQ ID NO: 112 es una secuencia de ADN sintética para expresión en la célula vegetal que codifica TIC713.

SEQ ID NO: 113 es una secuencia de ADN sintética para expresión en la célula vegetal que codifica TIC713.

- 5 SEQ ID NO: 114 es una secuencia de ADN sintética para expresión en la célula vegetal que codifica TIC843.

SEQ ID NO: 115 es una secuencia de ADN sintética para expresión en la célula vegetal que codifica TIC862.

10

SEQ ID NO: 116 es una secuencia de ADN sintética para expresión en la célula vegetal que codifica TIC1099.

- 15 SEQ ID NO: 117 es una secuencia de ADN sintética para expresión en la célula vegetal que codifica TIC1103.

SEQ ID NO: 118 es una secuencia de ADN sintética para expresión en la célula vegetal que codifica TIC845.

- 20 SEQ ID NO: 119 es una secuencia de ADN sintética para expresión en la célula vegetal que codifica TIC846.

SEQ ID NO: 120 es una secuencia de ADN sintética para expresión en la célula vegetal que codifica TIC858.

25

SEQ ID NO: 121 es una secuencia de ADN sintética para expresión en la célula vegetal que codifica TIC866.

- 30 SEQ ID NO: 122 es una secuencia de ADN sintética para expresión en la célula vegetal que codifica TIC838.

SEQ ID NO: 123 es una secuencia de ADN sintética para expresión en la célula vegetal que codifica TIC841.

SEQ ID NO: 124 es una secuencia de ADN sintética para expresión en la célula vegetal que codifica TIC842.

5 SEQ ID NO: 125 es una secuencia de ADN sintética para expresión en la célula vegetal que codifica TIC850.

SEQ ID NO: 126 es una secuencia de ADN sintética para expresión en la célula vegetal que codifica TIC859.

10 SEQ ID NO: 127 es una secuencia de ADN sintética para expresión en la célula vegetal que codifica TIC861.

SEQ ID NO: 128 es una secuencia de ADN sintética para expresión en la célula vegetal que codifica TIC848.

15 SEQ ID NO: 129 es una secuencia de ADN sintética para expresión en la célula vegetal que codifica TIC849.

20 SEQ ID NO: 130 es una secuencia de ADN sintética para expresión en la célula vegetal que codifica TIC847.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 El problema en la técnica del control de plagas puede caracterizarse como la necesidad de nuevas proteínas insecticidas que sean eficaces contra plagas objetivo, presenten un espectro amplio de toxicidad contra especies de plagas objetivo, sean capaces de ser expresadas en plantas sin causar problemas agrícolas no deseados y proporcionen un modo alternativo de acción en comparación con las toxinas actuales que se usan comercialmente en plantas. Se describen en la presente proteínas quiméricas insecticidas novedosas, y se aborda cada una de estas necesidades, particularmente contra un amplio espectro de plagas de insectos lepidópteros.

Para evitar el desarrollo o sortear la resistencia de insectos contra las proteínas

insecticidas usadas actualmente, se necesitan nuevas proteínas insecticidas con modos de acción (MOA, por sus siglas en inglés) diferentes, así como un espectro y eficacia amplios para el control de lepidópteros. Una forma de abordar esta necesidad es descubrir nuevas proteínas insecticidas a partir de fuentes biológicas diversas, preferentemente de bacterias, hongos o plantas. Otro abordaje es intercambiar segmentos entre varias proteínas de *Bt* que presenten similitudes estructurales para crear proteínas de *Bt* quiméricas nuevas que tengan propiedades inhibitoras de insectos. Se conoce en la técnica que la posibilidad de crear de una proteína quimérica con propiedades mejoradas a partir de la redistribución de estructuras de dominio de las numerosas proteínas cristalinas insecticidas naturales conocidas en la técnica es remota. Ver, por ejemplo, Jacqueline S. Knight, et ál. "A Strategy for Shuffling Numerous *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein Domains." *J. Economic Entomology*, 97 (6) (2004): 1805-1813.

Se describen en la presente secuencias de moléculas de ácido nucleico recombinante que codifican proteínas quiméricas insecticidas. Estas proteínas insecticidas abordan la necesidad continua en la técnica de modificar genéticamente proteínas insecticidas tóxicas adicionales con propiedades insecticidas mejoradas, tal como una eficacia mejorada contra un amplio espectro de especies de plagas de insecto objetivo y modos de acción diferentes. Los miembros de este grupo de proteínas, inclusive los ejemplos de proteínas descritos en la presente, presentan actividad insecticida contra especies de plagas de insectos lepidópteros.

El término "segmento" o "fragmento" se usa en esta solicitud para describir secuencias consecutivas de aminoácidos o ácido nucleico que son más cortas que secuencias completas de aminoácidos o ácido nucleico que describen una proteína quimérica insecticida descrita. Un segmento o fragmento que presenta una actividad inhibidora de insectos también se describe en la presente solicitud si la alineación de dicho segmento o fragmento con la sección correspondiente de la proteína quimérica insecticida da como resultado una identidad de secuencia de aminoácidos de cualquier porcentaje desde alrededor de 65 a alrededor de 100 por ciento entre el segmento o fragmento y la sección correspondiente de la proteína quimérica insecticida.

La referencia en la presente solicitud a los términos “activo” o “actividad”, “actividad pesticida” o “pesticida”, o “actividad insecticida”, “inhibidor de insectos” o “insecticida” se refiere a la eficacia de un agente tóxico, tal como una proteína insecticida, para inhibir (inhibir el crecimiento, la alimentación, fecundidad o viabilidad), suprimir (suprimir el crecimiento, alimentación, fecundidad o viabilidad), controlar (controlar la infestación de plagas, controlar las actividades de alimentación de las plagas en un cultivo en particular que contiene una cantidad eficaz de la proteína insecticida) o matar (producir la morbilidad, mortalidad o reducir la fecundidad de) una plaga. Se pretende que estos términos incluyan el resultado de proporcionar una cantidad eficaz como pesticida de una proteína insecticida a una plaga, donde la exposición de la plaga a la proteína insecticida da como resultado la morbilidad, mortalidad, reducción de la fecundidad o aturdimiento. Estos términos también incluyen la repulsión de la plaga de la planta, un tejido de la planta, una parte de la planta, semillas, células vegetales, o de una ubicación geográfica en particular donde la planta puede estar creciendo, como resultado de proporcionar una cantidad eficaz como pesticida de la proteína insecticida en o sobre la planta. En general, la actividad insecticida se refiere a la capacidad de una proteína insecticida de ser eficaz para inhibir el crecimiento, desarrollo, viabilidad, comportamiento de alimentación, comportamiento de apareamiento, fecundidad o cualquier disminución medible en los efectos adversos causados por un insecto que se alimenta de esa proteína, fragmento de proteína, segmento de proteína o polinucleótido de una plaga objetivo particular, inclusive, de modo no taxativo, insectos del orden Lepidoptera. La proteína insecticida puede ser producida por la planta o puede aplicarse a la planta o al entorno dentro de la ubicación donde se encuentra la planta. Los términos “bioactividad”, “eficaz”, “eficacia” o variaciones de estos también son términos intercambiables utilizados en esta solicitud para describir los efectos de las proteínas químicas insecticidas de la presente invención sobre plagas de insectos objetivo.

Una cantidad eficaz como insecticida de un agente tóxico, cuando se proporciona a la dieta de una plaga objetivo, presente actividad pesticida cuando el agente tóxico entra en contacto con la plaga. Un agente tóxico puede ser una proteína insecticida o uno o más agentes químicos conocidos en la técnica. Los agentes químicos insecticidas y los agentes de proteína insecticida pueden usarse solos o en

combinaciones entre sí. Los agentes químicos incluyen, de modo no taxativo, moléculas de ARNdc que se dirigen a genes específicos para la supresión en una plaga objetivo, organocloruros, organofosfatos, carbamatos, piretroides, neonicotinoides y rianoides. Los agentes de proteína insecticida incluyen las

5 proteínas quiméricas insecticidas establecidas en la presente solicitud, así como otros agentes tóxicos proteináceos que incluyen los que se dirigen a especies de plagas de lepidópteros, así como toxinas de proteína que se usan para controlar otras plagas vegetales, tal como proteínas de Cry disponibles en la técnica para su uso para controlar especies de coleópteros, tisanópteros, hemípteros y homópteros.

10

Se pretende que la referencia a una plaga, particularmente una plaga de una planta de cultivo, signifique plagas de insectos de plantas de cultivo, particularmente las plagas de lepidópteros que son controladas mediante las proteínas quiméricas insecticidas descritas. Sin embargo, la referencia a una plaga también puede incluir

15 plagas de insectos coleópteros, hemípteros y homópteros de plantas, así como nematodos y hongos cuando los agentes tóxicos que se dirigen a estas plagas se colocan o presentan junto con la proteína quimérica insecticida, o una proteína que sea 65 a alrededor de 100 idéntica a la proteína quimérica insecticida.

20 Las proteínas quiméricas insecticidas descritas en la presente presentan actividad insecticida contra plagas de insectos de la especie de insectos lepidópteros, inclusive adultos, pupas, larvas y neonatos, así como la especie de insectos hemípteros, inclusive adultos y ninfas. Los insectos del orden de los lepidópteros incluyen, de modo no taxativo, cogolleros, cortadores, medidores y polillas de la

25 familia Noctuidae, por ejemplo, cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), gusano soldado (*Spodoptera exigua*), gusano de las crucíferas (*Mamestra configurata*), gusano cortador grasiento (*Agrotis ipsilon*), gusano falso medidor (*Trichoplusia ni*), lagarta verde (*Pseudaletia includens*), oruga de las leguminosas (*Anticarsia gemmatilis*), gusano verde de la soja (*Hypena scabra*), gusano bellotero (*Heliothis virescens*), gusano trozador (*Agrotis subterranea*), oruga militar verdadera

30 (*Pseudaletia unipuncta*), gusano cortador pálido del oeste (*Agrotis orthogonia*); barrenadores, bichos canasto, tejedores, gusanos de las piñas, gusanos de la col y esqueletizadores de la familia Pyralidae, por ejemplo, taladro del maíz (*Ostrinia nubilalis*), gusano de la naranja navel (*Amyelois transitella*), gusano de la raíz del

maíz (*Crambus caliginosellus*), gusano tejedor del césped (*Herpetogramma licarsisalis*), palomilla del capítulo (*Homoeosoma electellum*), gusano perforador del brote (*Elasmopalpus lignosellus*); enrolladores de hojas, gusanos belloteros, gusanos de las semillas y gusanos de las frutas de la familia Tortricidae por ejemplo,

5 polilla del manzano (*Cydia pomonella*), polilla de la uva (*Endopiza viteana*), polilla oriental del duraznero (*Grapholita molesta*), polilla de la yema del girasol (*Suleima helianthana*); y muchos otros lepidópteros económicamente importantes, por ejemplo, palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*), gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*) y polilla gitana (*Lymantria dispar*). Otras plagas de insectos del orden

10 Lepidoptera incluyen, por ejemplo, *Alabama argillacea* (gusano medidor de la hoja del algodón), *Archips argyrospila* (enrollador de hojas frutales), *Archips rosana* (enrollador de los brotes) y otras especies de *Archips*, *Chilo suppressalis* (barrenador del arroz o barrenador del tallo del arroz), *Cnaphalocrocis medinalis* (enrollador de las hojas de arroz), *Crambus caliginosellus* (gusano de la raíz del

15 maíz), *Crambus teterrellus* (oruga del césped), *Diatraea grandiosella* (barrenador del maíz), *Diatraea saccharalis* (barrenador de la caña de azúcar), *Earias insulana* (oruga espinosa), *Earias vittella* (gusano moteado), *Helicoverpa armigera* (gusano cogollero), *Helicoverpa zea* (gusano elotero, gusano del fruto o gusano de algodón), *Heliothis virescens* (gusano bellotero), *Herpetogramma licarsisalis* (gusano tejedor

20 del césped), *Lobesia botrana* (polilla del racimo de la vid), *Phyllocnistis citrella* (minador de hojas de los cítricos), *Pieris brassicae* (blanca de la col), *Pieris rapae* (mariposa de la col o blanquita de la col), *Plutella xylostella* (palomilla dorso de diamante), *Spodoptera exigua* (gusano soldado), *Spodoptera litura* (gusano gris del tabaco o gusano defoliador) y *Tuta absoluta* (polilla de tomate).

25

Se pretende que la referencia en la presente solicitud a una “molécula aislada de ADN”, o una frase o término equivalente, signifique que la molécula de ADN está presente sola o en combinación con otras composiciones, pero no está en su entorno natural. Por ejemplo, los elementos de ácido nucleico, tales como una

30 secuencia codificante, una secuencia de intrones, una secuencia líder sin traducir, una secuencia promotora, una secuencia de terminación transcripcional y similares, que se encuentran naturalmente dentro del ADN del genoma de un organismo no se consideran “aisladas”, siempre y cuando el elemento esté dentro del genoma del organismo y en la ubicación dentro del genoma en el que se encuentra

- naturalmente. Sin embargo, cada uno de estos elementos y subpartes de estos elementos podrían estar “aislados” dentro del alcance de la descripción, siempre que el elemento no esté dentro del genoma del organismo ni en la ubicación dentro del genoma en la cual se encuentra naturalmente. De manera similar, una
- 5 secuencia de nucleótidos que codifica una proteína insecticida o cualquier variante insecticida de origen natural de la proteína podría ser una secuencia de nucleótidos aislada siempre que la secuencia de nucleótidos no esté dentro del ADN de la bacteria en la cual la secuencia que codifica la proteína se encuentra naturalmente. Una secuencia sintética de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de
- 10 la proteína insecticida de origen natural se podría considerar aislada a los fines de la presente descripción. A los fines de la presente descripción, cualquier secuencia transgénica de nucleótidos, es decir, la secuencia de nucleótidos del ADN insertado en el genoma de las células de una planta o bacteria, o presente en un vector extracromosómico, se podría considerar una secuencia aislada de nucleótidos ya
- 15 sea que esté presente dentro del plásmido o estructura similar usada para transformar la célula, dentro del genoma de la planta o bacteria, o presente en cantidades detectables en tejidos, progenie, muestras biológicas o productos de materia prima derivados de la planta o bacteria.
- 20 Tal como se describe adicionalmente en los Ejemplos, a través de un esfuerzo de quimeragénesis, se produjeron alrededor de 844 (ochocientos cuarenta y cuatro) secuencia que codifican proteínas quiméricas insecticidas a partir de los dominios de protoxina y toxina de toxinas insecticidas conocidas (mencionadas en la presente como las “proteínas originales”) y se expresaron y evaluaron en un bioensayo para
- 25 verificar la actividad en lepidópteros. Una cantidad pequeña de las proteínas quiméricas insecticidas producidas presentó una actividad contra lepidópteros mejorada o un espectro de lepidópteros potenciado en comparación con las proteínas originales de las cuales sus componentes de toxina se derivaron.
- 30 Estas proteína quiméricas insecticidas novedosas con actividad contra lepidópteros mejorada o un espectro de lepidópteros potenciado se produjeron a partir de los siguientes dominios de toxina y protoxina de proteína insecticida original: Cry1Ah (Dominio I), Cry1Bb1 (Dominios I y II), Cry 1Be2 (Dominios I y II), Cry1Ja1 (Dominios I y II), Cry1Fa1 (Dominios I y II), Cry1Ac (Dominio II y protoxina), Cry1Ca

(Dominio III y protoxina), Cry1Ka (Dominio III and protoxina), Cry1Jx (Dominio III), Cry1Ab (Dominio III), Cry1Ab3 (protoxina), Cry1Da1 (protoxina), Cry4 (protoxina), Cry9 (protoxina), Cry1Be (protoxina) y Cry1Ka (protoxina).

- 5 Específicamente, las proteínas quiméricas insecticidas de la presente invención con actividad contra lepidópteros mejorada o un espectro de lepidópteros potenciado, comprenden las siguientes combinaciones de dominio y protoxina: TIC1100/SEQ ID NO:4 (Dominio I- Cry1Ah, Dominio II- Cry1Ac, Dominio III- Cry1Ca, Protoxina- Cry1Ac), TIC860/SEQ ID NO:7 (Dominio I- Cry1Bb1, Dominio II- Cry1BB1, Dominio
10 III- Cry1Ca, Protoxina- Cry1Ac), TIC867/SEQ ID NO:10 (Dominio I- Cry1Be2, Dominio II- Cry1Be2, Dominio III- Cry1Ka, Protoxina- Cry1Ab3), TIC868/SEQ ID NO:28 (Dominio I- Cry1Be2, Dominio II- Cry1Be2, y Dominio III- Cry1Ca, Protoxina- Cry1Ab3), TIC869/SEQ ID NO:50 (Dominio I- Cry1Ja1, Dominio II- Cry1Ja1, Dominio III- Cry1Jx, Protoxina- Cry1Ab3) y TIC836/SEQ ID NO:53 (Dominio I- Cry1Fa1,
15 Dominio II- Cry1Fa1, Dominio III- Cry1Ab, Protoxina- Cry1Ac).

- Las variantes en las cuales se introdujeron sustituciones de aminoácidos o dominios alternativos protoxina y también se produjeron para las proteínas quiméricas insecticidas TIC867 y TIC868. Específicamente, estas variantes de TIC867 y TIC868
20 comprenden las siguientes sustituciones de aminoácidos o dominios de protoxina alternativos: TIC867_20/SEQ ID NO:13 (dominio de protoxina alternativo Cry1Da1), TIC867_21/SEQ ID NO:16 (dominio de protoxina alternativo Cry4), TIC867_22/SEQ ID NO:19 (dominio de protoxina alternativo Cry9), TIC867_23/SEQ ID NO:21 (dominio de protoxina alternativo Cry1Be), TIC867_24/SEQ ID NO:23 (dominio de
25 protoxina alternativo Cry1Ka), TIC867_25/SEQ ID NO: 25 (dominio de protoxina alternativo Cry1Ka), TIC868_9/SEQ ID NO:30 (modificación de aminoácidos N240S_Y343Q_N349T), TIC868_10/SEQ ID NO:33 (dominio de protoxina alternativo Cry1Da1), TIC868_11/SEQ ID NO:36 (dominio de protoxina alternativo Cry4), TIC868_12/SEQ ID NO:39 (dominio de protoxina alternativo Cry 9),
30 TIC868_13/SEQ ID NO:41 (dominio de protoxina alternativo Cry1Be), TIC868_14/SEQ ID NO:43 (dominio de protoxina alternativo Cry1Ka), TIC868_15/SEQ ID NO:45 (dominio de protoxina alternativo Cry1Ca), y TIC868_29/SEQ ID NO:47 (modificación de aminoácidos Q136Y_Y343Q_N349T).

Tal como se demuestra en los Ejemplos, cada una de estas variantes TIC867 y TIC868 alteraron la actividad contra lepidópteros y/o redujo el espectro de actividad de lepidópteros de la proteína quimérica insecticida original, lo cual indica que el dominio de protoxina alternativo y las sustituciones de aminoácidos tuvo un efecto directo sobre el espectro y actividad insecticida de las proteínas quiméricas insecticidas TIC867 y TIC868.

Muchas de las proteínas quiméricas insecticidas presentaron actividad insecticida contra múltiples especies de plagas de insectos lepidópteros. Específicamente, las proteínas quiméricas insecticidas novedosas descritas en la presente solicitud presentaron actividad contra una o más de las siguientes plagas de lepidópteros, oruga de las leguminosas (VBC, *Anticarsia gemmatilis*), barrenador de la caña de azúcar (SCB, *Diatraea saccharalis*), gusano perforador del brote (LSCB, *Elasmopalpus lignosellus*), gusano elotero (CEW, *Helicoverpa zea*), gusano de la vaina de la soja (SPW, *Helicoverpa zea*), gusano de algodón (CBW, *Helicoverpa zea*), gusano bellotero (TBW, *Heliothis virescens*), lagarta verde (SBL, *Chrysodeixis includens*), gusano soldado africano (BLAW, *Spodoptera cosmioides*), gusano meridional (SAW, *Spodoptera eridania*), cogollero del maíz (FAW, *Spodoptera frugiperda*), gusano soldado (BAW, *Spodoptera exigua*), gusano cogollero (OBW, *Helicoverpa armigera*), gusano gris del tabaco (OLW, *Spodoptera litura*), gusano rosado (PBW, *Pectinophora gossypiella*), barrenador del maíz (SWCB, *Diatraea grandiosella*), gusano moteado (SBW, *Earias vitella*), gusano cogollero (SABW, *Helicoverpa gelotopon*) y oruga medidora (SFL, *Rachiplusia nu*). Por lo tanto, los ejemplos de proteínas descritos en la presente solicitud se relacionan mediante la función común y presentan actividad insecticida contra plagas de insectos de la especie de insectos Lepidoptera, inclusive adultos, larvas y pupas.

Las proteínas que se asemejan a proteínas quiméricas insecticidas pueden identificarse mediante comparación entre sí, usando varios algoritmos informáticos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las identidades de secuencia de aminoácidos de proteínas relacionadas con las proteínas quiméricas insecticidas pueden analizarse usando una alineación Clustal W usando los siguientes parámetros por defecto: Matriz de peso: blosum, penalización por abertura de hueco: 10,0, Penalización por extensión de hueco: 0,05, Huecos hidrofílicos: Activado, Residuos

hidrofílicos: GPSNDQERK, Penalizaciones por huecos específicos de residuos: Activado (Thompson, et ál. (1994) Nucleic Acids Research, 22:4673-4680). El porcentaje de identidad de aminoácidos se calcula adicionalmente mediante el producto de 100 % multiplicado por (identidades de aminoácidos/longitud de la proteína de la invención). También están disponibles en la técnica otros algoritmos de alineación, estos proporcionan resultados similares a los obtenidos usando la alineación Clustal W y se contemplan en la presente solicitud.

Se pretende que una proteína de consulta que presente actividad inhibidora de insectos se describa en la presente solicitud si la alineación de dicha proteína de consulta con las proteínas quiméricas insecticidas de la invención establecidas en las SEQ ID NO: 4, 7, 10, 13, 16, 19, 21, 23, 25, 28, 30, 33, 36, 39, 41, 43, 45, 47, 50, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 y 111 tiene como resultado una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos alrededor de 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o alrededor de 100 % (o cualquier porcentaje dentro del intervalo) entre la proteína de consulta y la de la invención.

Tal como se describe adicionalmente en los Ejemplos de la presente solicitud, las secuencias sintéticas o artificiales que codifican las proteínas quiméricas insecticidas se diseñaron para su uso en plantas. Los ejemplos de secuencias sintéticas de nucleótidos que se diseñaron para su uso en plantas se establecen en las SEQ ID NO: 2 and 3 (TIC1100), SEQ ID NO:6 (TIC860), SEQ ID NO:9 (TIC867), SEQ ID NO:12 (TIC867_20), SEQ ID NO:15 (TIC867_21), SEQ ID NO:18 (TIC867_22), SEQ ID NO:20 (TIC867_23), SEQ ID NO:22 (TIC867_24), SEQ ID NO: 24 (TIC867_25), SEQ ID NO:27 (TIC868), SEQ ID NO:29 (TIC868_9), SEQ ID NO:32 (TIC868_10), SEQ ID NO:35 (TIC868_11), SEQ ID NO:38 (TIC868_12), SEQ ID NO:40 (TIC868_13), SEQ ID NO:42 (TIC868_14), SEQ ID NO:44 (TIC868_15), SEQ ID NO:46 (TIC868_29), SEQ ID NO:49 (TIC869) y SEQ ID NO:52 (TIC836), SEQ ID NO:112 y 113 (TIC713), SEQ ID NO:114 (TIC843), SEQ ID NO:115 (TIC862), SEQ ID NO:116 (TIC1099), SEQ ID NO:117 (TIC1103), SEQ ID NO_118 (TIC845), SEQ ID NO:119 (TIC846), SEQ ID NO:120 (TIC858), SEQ ID NO:121

(TIC866), SEQ ID NO:122 (TIC838), SEQ ID NO:123 (TIC841), SEQ ID NO:124 (TIC842), SEQ ID NO:125 (TIC850), SEQ ID NO:126 (TIC859), SEQ ID NO:127 (TIC861), SEQ ID NO:128 (TIC848), SEQ ID NO:129 (TIC849) y SEQ ID NO:130 (TIC847).

5

Para la expresión en células vegetales, las proteínas quiméricas insecticidas pueden expresarse para residir en el citosol o dirigirse a varios orgánulos de la célula vegetal. Por ejemplo, dirigir una proteína hacia el cloroplasto puede dar como resultado un aumento en los niveles de proteína expresada en una planta transgénica, a la vez que previene la aparición de elementos fuera del fenotipo. El direccionamiento también puede dar como resultado la eficacia de resistencia a las plagas en el evento transgénico. Un péptido objetivo o péptido de tránsito es una cadena peptídica corta (3-70 aminoácidos de longitud) que dirige el transporte de una proteína hacia una región específica en la célula, inclusive el núcleo, mitocondria, retículo endoplásmico (RE), cloroplasto, apoplasto, peroxisoma y membrana plasmática. Algunos péptidos objetivo se escinden de la proteína mediante peptidasas de señal luego de que las proteínas son transportadas. Para dirigirse hacia el cloroplasto, las proteínas contienen péptidos de tránsito que tienen alrededor de 40-50 aminoácidos. Por descripciones del uso de péptidos de tránsito a cloroplastos, véanse las patentes estadounidenses n.º 5,188,642 y 5,728,925. Muchas de las proteínas localizadas en cloroplastos se expresan a partir de genes nucleares como precursores y se dirigen al cloroplasto mediante un péptido de tránsito a cloroplastos (CTP, por sus siglas en inglés). Los ejemplos de dichas proteínas de cloroplastos aislados incluyen, de modo no taxativo, las asociadas con la subunidad pequeña (SSU) de ribulosa-1,5,-bisfosfato carboxilasa, ferredoxina, ferredoxina oxidoreductasa, la proteína I y proteína II del complejo captador de luz, tioredoxina F, enolpiruvil shikimato fosfato sintasa (EPSPS), y los péptidos de tránsito descritos en la patente estadounidense n.º 7,193,133. Se ha demostrado *in vivo* e *in vitro* que las proteínas que no son cloroplastos pueden dirigirse al cloroplasto mediante el uso de fusiones de proteínas con un CTP heterólogo, y que el CTP es suficiente para dirigir una proteína hacia el cloroplasto. Se ha observado que la incorporación de un péptido de tránsito a cloroplastos adecuado, tal como *Arabidopsis thaliana* EPSPS CTP (CTP2) (véase, Klee et ál., *Mol. Gen. Genet.* 210:437-442, 1987) o *Petunia hybrida* EPSPS CTP (CTP4) (véase della-Cioppa et

- ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:6873-6877, 1986) dirige secuencias de proteína de EPSPS heteróloga a cloroplastos en plantas transgénicas (veánse las patentes estadounidenses n.º 5,627,061; 5,633,435; y 5,312,910; y EP 0218571; EP 189707; EP 508909; y EP 924299). Para dirigir las proteínas quiméricas insecticidas hacia el
- 5 cloroplasto, una secuencia que codifica un péptido de tránsito a cloroplastos se coloca en la posición 5', unido de manera operativa y en el marco de una secuencia codificante sintética que codifica la proteína quimérica insecticida que se diseñó para su expresión óptima en células vegetales.
- 10 Los vectores y casetes de expresión que contienen estas secuencias de nucleótidos artificiales o sintéticas se construyeron e introdujeron en células vegetales de maíz, algodón y soja, de acuerdo con métodos y técnicas de transformación que son conocidas en la técnica. Las células transformadas se regeneraron en plantas transformadas, que se observó que expresaban la proteína quimérica insecticida.
- 15 Para evaluar la actividad pesticida, se llevaron a cabo bioensayos en presencia de larvas de plagas de lepidópteros usando discos de hoja vegetal obtenidos de las plantas transformadas. Se contemplan composiciones de moléculas de ácido nucleico recombinante que codifican proteínas quiméricas insecticidas. Por ejemplo, las proteínas quiméricas insecticidas pueden expresarse con construcciones de
- 20 ADN recombinante en las cuales una molécula de polinucleótido con un ORF que codifica una proteína quimérica insecticida está unida de manera operativa a elementos de expresión genética, tal como un promotor, y cualquier otro elemento regulador necesario para la expresión en el sistema para el cual está destinada la construcción. Los ejemplos no taxativos incluyen un promotor funcional vegetal
- 25 unido de manera operativa a las secuencias sintéticas que codifican la proteína quimérica insecticida para la expresión de la proteína quimérica insecticida en plantas o un promotor funcional de *Bt* unido de manera operativa a una secuencia que codifica una proteína quimérica insecticida para la expresión de la proteína en una bacteria *Bt* u otra especie *Bacillus*. Otros elementos pueden estar unidos de
- 30 manera operativa a las secuencias que codifican proteínas quiméricas insecticidas, inclusive, de modo no taxativo, potenciadores, intrones, líderes no traducidos, etiquetas de inmovilización de proteínas codificadas (etiqueta His), péptidos de translocación (es decir, péptidos de tránsito a plástidos, péptidos de señal), secuencias de polipéptidos para enzimas de modificación postraduccional, sitio de

unión a ribosomas y sitios de direccionamiento a iARN.

Los ejemplos de moléculas recombinantes de polinucleótidos proporcionados en la presente incluyen, de modo no taxativo, un promotor heterólogo unido de manera operativa a un polinucleótido, tal como las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 27, 29, 31, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 49, 51, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129 y 130; que codifica el polipéptido o proteína que tiene la secuencia de aminoácidos tal como se establece en las SEQ ID NO: 4 (TIC1100), 7 (TIC860), 10 (TIC867), 13 (TIC867_20), 16 (TIC867_21), 19 (TIC867_22), 21 (TIC867_23), 23 (TIC867_24), 25 (TIC867_25), 28 (TIC868), 30 (TIC868_9), 33 (TIC868_10), 36 (TIC868_11), 39 (TIC867_12), 41 (TIC867_13), 43 (TIC867_14), 45 (TIC867_15), 47 (TIC867_29), 50 (TIC869), 53 (TIC836), 55 (TIC713), 57 (TIC843), 59 (TIC862), 61 (TIC1099), 63 (TIC1099-T507E), 65 (TIC1099-R522K), 67 (TIC1099-K490S), 69 (TIC1099-T562R), 71 (TIC1099-S533R), 73 (TIC1099-G498D), 75 (TIC1099-K490A), 77 (TIC1099-E564A), 79 (TIC1103), 81 (TIC1101), 83 (TIC845), 85 (TIC846), 87 (TIC858), 89 (TIC865), 91 (TIC866), 93 (TIC838), 95 (TIC839), 97 (TIC841), 99 (TIC842), 101 (TIC850), 103 (TIC859), 105 (TIC861), 107 (TIC848), 109 (TIC849) y 111 (TIC847). Un promotor heterólogo también puede estar unido de manera operativa a secuencias sintéticas codificantes de ADN que codifican una proteína quimérica insecticida dirigida a pláستidos y una proteína quimérica insecticida no dirigida. Se contempla que los codones de una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica una proteína quimérica insecticida descrita en la presente pueden sustituirse por codones sinónimos (conocido en técnica como sustitución silenciosa).

Una construcción o molécula recombinante de ADN que comprende una secuencia codificante de proteína quimérica insecticida puede comprender además una región de ADN que codifique uno o más agentes tóxicos que pueden configurarse para expresarse o coexpresarse de forma concomitante con una secuencia de ADN que codifica una proteína quimérica insecticida, una proteína distinta de una proteína quimérica insecticida, una molécula de ARNcd inhibidora de insectos, o una proteína auxiliar. Las proteínas auxiliares incluyen, de modo no taxativo, cofactores,

enzimas, compañeros de unión u otros agentes que funcionan para contribuir a la eficacia de un agente inhibidor de insectos, por ejemplo, al contribuir a su expresión, al influenciar su estabilidad en plantas, optimizando energía libre para la oligomerización, aumentando su toxicidad y su espectro de actividad. Una proteína

5 auxiliar puede facilitar la absorción de uno o más agentes inhibidores de insectos, por ejemplo, o potenciar los efectos tóxicos del agente tóxico.

Una construcción o molécula recombinante de ADN puede disponerse de forma que todas las proteínas o moléculas de ARNcd se expresen desde un promotor o cada

10 proteína o molécula de ARNcd esté bajo el control de promotores separados, o una combinación de estos. Las proteínas de esta invención pueden expresarse desde un sistema de expresión multigénico en el cual una proteína quimérica insecticida se expresa desde un segmento de nucleótidos común que también contiene otros promotores y marcos de lectura abiertos, dependiendo del tipo de sistema de

15 expresión seleccionado. Por ejemplo, un sistema de expresión multigénico bacteriano puede utilizar un único promotor para dirigir la expresión de marcos de lectura abiertos en conjunto/unidos de forma múltiple del interior de un único operón (es decir, expresión policistrónico). En otro ejemplo, un sistema de expresión multigénico vegetal puede utilizar casetes de expresión no unidos de forma múltiple,

20 donde cada uno expresa una proteína distinta u otro agente tóxico, tal como una o más moléculas de ARNcd.

Las moléculas de ácido nucleico recombinantes o construcciones de ADN recombinante que comprenden secuencias codificantes de proteínas quiméricas

25 insecticidas pueden administrarse a las células hospedadoras mediante vectores, por ejemplo, un plásmido, baculovirus, cromosoma sintético, virión, cósmido, fagémido, fago o vector viral. Dichos vectores pueden utilizarse para lograr una expresión estable o transitoria de una secuencia codificante de proteína quimérica insecticida en una célula hospedadora, o expresión posterior del polipéptido

30 codificado. Un polinucleótido recombinante exógeno o construcción de ADN recombinante que comprende una secuencia codificante de proteína quimérica insecticida y que se introduce en una célula hospedadora se denomina en la presente "transgén".

Se proporcionan en la presente bacterias transgénicas, células vegetales transgénicas, plantas transgénicas y partes de plantas transgénicas que contienen un polinucleótido que codifica una o más de las proteínas quiméricas insecticidas. La expresión “célula bacteriana” o “bacteria” puede incluir, de modo no taxativo, una

5 célula *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas* o *Rhizobium*. La expresión “célula vegetal” o “planta” puede incluir, de modo no taxativo, una célula dicotiledónea o una célula monocotiledónea. Las plantas y células vegetales contempladas incluyen, de modo no taxativo, planta o célula vegetal de alfalfa, banana, cebada, poroto, brócoli, repollo, brassica, zanahoria,

10 yuca, ricino, coliflor, apio, garbanzo, repollo chino, citrus, coco, café, maíz, trébol, algodón, cucurbita, pepino, abeto de Douglas, berenjena, eucalipto, lino, ajo, uva, lúpulo, puerro, lechuga, pino taeda, mijo, melón, nuez, avena, oliva, cebolla, ornamental, palma, prado, arveja, maní, pimienta, dahl, pino, papa, álamo, calabaza, pino insigne, rábano, semilla de colza, arroz, rizoma, centeno, azafrán, arbusto,

15 sorgo, pino del sur, soja, espinaca, calabacín, fresa, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, maíz dulce, liquidámbar, boniato, pasto varilla, té, tabaco, tomate, triticale, césped, sandía y trigo. En determinadas modalidades, se proporcionan plantas transgénicas y partes de plantas transgénicas regeneradas a partir de una célula vegetal transgénica. En determinadas modalidades, las plantas transgénicas

20 pueden obtenerse a partir de una semilla transgénica al cortar, quebrar, moler o desasociar de otra forma la parte de la planta. En determinadas modalidades, la parte de la planta puede ser una semilla, gorgojo, hoja, flor, tallo, raíz o cualquier parte de estas, o una parte no regenerable de una parte de planta transgénica. Tal como se utiliza en este contexto, una parte “no regenerable” de una parte de planta

25 transgénica es una parte que no puede inducirse para formar una planta completa o que no puede inducirse para formar una planta completa que sea capaz de producción sexual o asexual. En determinadas modalidades, una parte no regenerable de una parte de planta es una parte de una semilla, gorgojo, hoja, flor, tallo o raíz transgénica.

30

Se proporcionan métodos para confeccionar plantas transgénicas que comprenden cantidades inhibitoras de Lepidoptera de proteínas quiméricas insecticidas. Dichas plantas pueden confeccionarse mediante la introducción de un polinucleótido que codifica las proteínas quiméricas insecticidas proporcionadas en la presente

solicitud a una célula vegetal, y la selección de una planta derivada de dicha célula vegetal que expresa una cantidad inhibidora de Lepidoptera o insectos de la proteína quimérica insecticida. Las plantas pueden derivarse de células vegetales mediante técnicas de transformación de meristema, regeneración, semillas o polen.

- 5 Se conocen en la técnica métodos para transformar plantas. Por ejemplo, se describe la transformación mediada por *Agrobacterium* en las publicaciones de solicitudes de patente estadounidense 2009/0138985A1 (soja), 2008/0280361A1 (soja), 2009/0142837A1 (maíz), 2008/0282432 (algodón) y 2008/0256667 (algodón).
- 10 Las plantas que expresan las proteínas quiméricas insecticidas pueden cruzarse mediante la reproducción con eventos transgénicos que expresan otras proteínas insecticidas y/o que expresan otros rasgos transgénicos, tales como otros rasgos de control de insectos, genes de tolerancia a herbicidas, genes que confieren rasgos de tolerancia al estrés o resistencia y similares, o dichos rasgos pueden combinarse en
- 15 un único vector, de forma que se unan estos rasgos.

- También se describen en la presente solicitud productos vegetales procesados, donde el producto procesado comprende una cantidad detectable de una proteína quimérica insecticida, un segmento inhibidor de insectos o fragmento de este, o
- 20 cualquier parte distinguible de este. En determinadas modalidades, el producto procesado se selecciona del grupo que consiste en partes de plantas, biomasa vegetal, aceite, alimento, azúcar, pienso, harina, copos, salvado, hebras, vainas, semillas y semillas procesadas. En determinadas modalidades, el producto procesado no es regenerable. El producto vegetal puede comprender materias
 - 25 primas u otros productos comerciales derivados de una planta transgénica o parte de planta transgénica, donde las materias primas u otros productos pueden rastrearse a través del comercio mediante la detección de segmentos de nucleótidos, ARN expresado o proteínas que codifican o comprenden partes distinguibles de una proteína quimérica insecticida.

30

También se describen en esta solicitud métodos para controlar insectos, en particular plagas particulares de Lepidoptera de plantas de cultivo, con las proteínas quiméricas insecticidas. Dichos métodos pueden comprender cultivar una planta que comprende una cantidad inhibidora de Lepidoptera o insectos de la proteína

quimérica insecticida. En determinadas modalidades, dichos métodos pueden comprender además uno o más de: (i) aplicar cualquier composición que comprende o codifica una proteína quimérica insecticida a una planta o semilla que da paso a una planta; y (ii) transformar una planta o una célula vegetal que da paso a una

5 planta con un polinucleótido que codifica una proteína quimérica insecticida. En general, se contempla que las proteínas quiméricas insecticidas pueden proporcionarse en una composición, en un microorganismo o en una planta transgénica, para conferir una actividad inhibidora de insectos contra insectos lepidópteros.

10

En determinadas modalidades, la proteína quimérica insecticida es el ingrediente activo insecticida de una composición inhibidora de insectos preparada mediante el cultivo de *Bacillus* recombinante o cualquier otra célula bacteriana recombinante transformada para expresar una proteína quimérica insecticida en condiciones

15 adecuadas para la expresión. Dicha composición puede prepararse mediante desecación, liofilizado, homogenización, extracción, filtrado, centrifugado, sedimentación o concentración de un cultivo de dichas células recombinantes que expresan/producen la proteína quimérica insecticida. Dicho proceso puede producir un *Bacillus* u otro extracto de célula bacteriana entomopatógena, suspensión

20 celular, homogenato celular, lisado celular, sobrenadante celular, filtrado celular o sedimento celular. Al obtener la proteína quimérica insecticida producida de esta forma, una composición que incluye la proteína quimérica insecticida puede incluir células bacterianas, esporas bacterianas y cuerpos de inclusión paraesporal y pueden formularse para diversos usos, inclusive como productos agrícolas de

25 atomización inhibidores de insectos, o como formulaciones inhibidoras de insectos en bioensayos de dietas.

30

La formulación o compuesto antemencionado puede comprender además un portador aceptable desde el punto de vista agrícola, tal como un cebo, polvo, polvillo, sedimento, gránulo, spray, emulsión, suspensión coloidal, solución acuosa, espora *Bacillus* o preparación cristalina, o un tratamiento de semilla. El compuesto o formulación puede comprender además una planta, semilla, tejido vegetal o una célula vegetal recombinante transformada para expresar una o más de las proteínas, o bacteria transformada para expresar una o más de las proteínas.

Dependiendo del nivel de inhibición de insectos o inhibición insecticida inherente en el polipéptido recombinante y el nivel de compuesto o formulación a aplicar a un ensayo de dieta o planta, el compuesto o formulación puede incluir diversas cantidades en peso del polipéptido recombinante, por ejemplo, de 0,0001 % a 0,001 %, 0,01 % a 1 %, a 99 % en peso del polipéptido recombinante.

En una modalidad, con la finalidad de reducir la probabilidad del desarrollo de resistencia, una composición inhibidora de insectos o planta transgénica que comprende una proteína quimérica insecticida puede comprender además al menos un agente tóxico adicional que presente actividad de inhibición de insectos contra la misma especie de insectos lepidópteros, pero que sea distinto de la proteína quimérica insecticida. Otros agentes tóxicos posibles para dicha composición incluyen una proteína inhibidora de insectos y una molécula de ARNcd inhibidora de insectos. Un ejemplo para el uso de dichas secuencias de ribonucleótidos para controlar plagas de insectos se describe en Baum et ál. (publicación de patente estadounidense 2006/0021087 A1). Dichos polipéptidos adicionales para el control de pestes lepidópteras pueden seleccionarse del grupo que consiste en una proteína inhibidora de insectos, tal como, de modo no taxativo, Cry1A (patente estadounidense n.º 5,880,275), Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B (publicación de patente estadounidense No. 10/525,318), Cry1C (patente estadounidense n.º 6,033,874), Cry1D, Cry1E, Cry1F y quimeras de Cry1A/F (patentes estadounidenses n.º 7,070,982, 6,962,705 y 6,713,063), Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, Cry2A, Cry2Ab (patente estadounidense n.º 7,064,249), Cry2Ae, Cry4B, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry15, Cry43A, Cry43B, Cry51Aa1, ET66, TIC400, TIC800, TIC834, TIC1415, Vip3A, VIP3Ab, VIP3B, AXMI-001, AXMI-002, AXMI-030, AXMI-035, AND AXMI-045 (publicación de patente estadounidense 2013-0117884 A1), AXMI-52, AXMI-58, AXMI-88, AXMI-97, AXMI-102, AXMI-112, AXMI-117, AXMI-100 (publicación de patente estadounidense 2013-0310543 A1), AXMI-115, AXMI-113, AXMI-005 (publicación de patente estadounidense 2013-0104259 A1), AXMI-134 (publicación de patente estadounidense 2013-0167264 A1), AXMI-150 (publicación de patente estadounidense 2010-0160231 A1), AXMI-184 (publicación de patente estadounidense 2010-0004176 A1), AXMI-196, AXMI-204, AXMI-207, AXMI-209 (publicación de patente estadounidense 2011-0030096 A1), AXMI-218, AXMI-220 (publicación de patente estadounidense 2014-0245491 A1),

AXMI-221z, AXMI-222z, AXMI-223z, AXMI-224z, AXMI-225z (publicación de patente estadounidense 2014-0196175 A1), AXMI-238 (publicación de patente estadounidense 2014-0033363 A1), AXMI-270 (publicación de patente estadounidense 2014-0223598 A1), AXMI-345 (publicación de patente estadounidense 2014-0373195 A1), DIG-3 (publicación de patente estadounidense 2013-0219570 A1), DIG-5 (publicación de patente estadounidense 2010-0317569 A1), DIG-11 (publicación de patente estadounidense 2010-0319093 A1), AfIP-1A y derivados de estos (publicación de patente estadounidense 2014-0033361 A1), AfIP-1B y derivados de estos (publicación de patente estadounidense 2014-0033361 A1), PIP-1APIP-1B (publicación de patente estadounidense 2014-0007292 A1), PSEEN3174 (publicación de patente estadounidense 2014-0007292 A1), AECFG-592740 (publicación de patente estadounidense 2014-0007292 A1), Pput_1063 (publicación de patente estadounidense 2014-0007292 A1), Pput_1064 (publicación de patente estadounidense 2014-0007292 A1), GS-135 y derivados de este (publicación de patente estadounidense 2012-0233726 A1), GS153 y derivados de este (publicación de patente estadounidense 2012-0192310 A1), GS154 y derivados de este (publicación de patente estadounidense 2012-0192310 A1), GS155 y derivados de este (publicación de patente estadounidense 2012-0192310 A1), SEQ ID NO:2 y derivados de esta tal como se describe en la publicación de patente estadounidense 2012-0167259 A1, SEQ ID NO:2 y derivados de esta tal como se describe en la publicación de patente estadounidense 2012-0047606 A1, SEQ ID NO:2 y derivados de esta tal como se describe en la publicación de patente estadounidense 2011-0154536 A1, SEQ ID NO:2 y derivados de esta tal como se describe en la publicación de patente estadounidense 2011-0112013 A1, SEQ ID NO:2 y 4 y derivados de estas tal como se describe en la publicación de patente estadounidense 2010-0192256 A1, SEQ ID NO:2 y derivados de esta tal como se describe en la publicación de patente estadounidense 2010-0077507 A1, SEQ ID NO:2 y derivados de esta tal como se describe en la publicación de patente estadounidense 2010-0077508 A1, SEQ ID NO:2 y derivados de esta tal como se describe en la publicación de patente estadounidense 2009-0313721 A1, SEQ ID NO:2 o 4 y derivados de estas tal como se describe en la publicación de patente estadounidense 2010-0269221 A1, SEQ ID NO:2 y derivados de esta tal como se describe en la patente estadounidense n.º 7,772,465 (B2), CF161_0085 y derivados de este tal como se describe en WO2014/008054 A2, proteínas lepidópteras tóxicas

y sus derivados tal como se describe en las publicaciones de patente estadounidense US2008-0172762 A1, US2011-0055968 A1 y US2012-0117690 A1; SEQ ID NO:2 y derivados de esta tal como se describe en US7510878(B2), SEQ ID NO:2 y derivados de esta tal como se describe en la patente estadounidense n.º

5 7812129(B1); y similares.

En otras modalidades, una composición inhibidora de insectos o planta transgénica puede comprender además al menos un agente tóxico adicional que presenta actividad inhibidora de insectos a una plaga de insectos que no es inhibida por las

10 proteínas quiméricas insecticidas de la presente invención (tales como plagas de coleópteros, hemípteros y homópteros), con la finalidad de ampliar el espectro de la inhibición de insectos obtenida.

Dichos agentes tóxicos adicionales para el control de plagas de coleópteros pueden

15 seleccionarse del grupo que consiste en una proteína inhibidora de insectos, tal como, de modo no taxativo, Cry3Bb (patente estadounidense n.º 6,501,009), variantes de Cry1C, variantes de Cry3A, Cry3, Cry3B, Cry34/35, 5307, AXMI134 (publicación de patente estadounidense 2013-0167264 A1) AXMI-184 (publicación de patente estadounidense 2010-0004176 A1), AXMI-205 (publicación de patente

20 estadounidense 2014-0298538 A1), axmi207 (publicación de patente estadounidense 2013-0303440 A1), AXMI-218, AXMI-220 (publicación de patente estadounidense 20140245491A1), AXMI-221z, AXMI-223z (publicación de patente estadounidense 2014-0196175 A1), AXMI-279 (publicación de patente estadounidense 2014-0223599 A1), AXMI-R1 y variantes de este (publicación de

25 patente estadounidense 2010-0197592 A1, TIC407, TIC417, TIC431, TIC807, TIC853, TIC901, TIC1201, TIC3131, DIG-10 (publicación de patente estadounidense 2010-0319092 A1), eHIPs (publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2010/0017914), IP3 y variantes de este (publicación de patente estadounidense 2012-0210462 A1) y δ -Exatoxin-Hv1a (publicación de solicitud de

30 patente estadounidense US2014-0366227 A1).

Dichos agentes tóxicos adicionales para el control de plagas de hemípteros pueden seleccionarse del grupo que consiste en proteínas activas de hemípteros tales como, de modo no taxativo, TIC1415 (publicación de patente estadounidense 2013-

0097735 A1), TIC807 (patente estadounidense n.º 8609936), TIC834 (publicación de patente estadounidense 2013-0269060 A1), AXMI-036 (publicación de patente estadounidense 2010-0137216 A1) y AXMI-171 (publicación de patente estadounidense 2013-0055469 A1). Otros polipéptidos para el control de plagas de insectos coleópteros, lepidópteros y hemípteros pueden encontrarse en el sitio web de nomenclatura de toxinas de *Bacillus thuringiensis* mantenido por Neil Crickmore (en la web, en btnomenclature.info).

Las secuencias codificantes de proteínas quiméricas insecticidas y las secuencias que tienen un porcentaje sustancial de identidad con las proteínas quiméricas insecticidas pueden identificarse mediante el uso de métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hibridación y amplificación térmica. Por ejemplo, las proteínas quiméricas insecticidas pueden utilizarse para producir anticuerpos que se unen específicamente a proteínas relacionadas, y pueden utilizarse para buscar y hallar otras proteínas que se relacionen de forma estrecha.

Adicionalmente, las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas quiméricas insecticidas pueden utilizarse como sondas y cebadores para buscar e identificar otros miembros de la clase mediante el uso de métodos de hibridación y amplificación isotérmica o de ciclo térmico. Por ejemplo, los oligonucleótidos derivados de secuencias tal como se establece en la SEQ ID NO:2 pueden utilizarse para determinar la presencia o ausencia de un transgén quimérico insecticida en una muestra de ácido desoxirribonucleico derivada de un producto de materia prima. Dada la sensibilidad de determinados métodos de detección de ácido nucleico que emplean oligonucleótidos, se anticipa que los oligonucleótidos derivados de secuencias tal como se establecen en la SEQ ID NO:2 pueden utilizarse para detectar la proteína quimérica insecticida respectiva en productos de materia prima derivados de fuentes acumuladas donde solamente una parte del producto de materia prima se deriva de una planta transgénica que contiene cualquiera de la SEQ ID NO:2.

EJEMPLOS

En vista de lo que antecede, los expertos en la técnica observarán que las siguientes modalidades descritas son meramente representativas de la invención, que puede realizarse de diversas formas. Por lo tanto, los detalles funcionales y estructurales específicos descritos en la presente no deben interpretarse como taxativos.

EJEMPLO 1

Creación y clonación de secuencias de codificación de proteínas quiméricas insecticidas novedosas activas para lepidópteros

El presente Ejemplo ilustra la creación de las proteínas quiméricas insecticidas novedosas y la clonación y expresión de las proteínas quiméricas insecticidas.

Las secuencias de ácido nucleico recombinante se construyeron a partir de genes de proteína Cry para producir secuencias de polinucleótidos que codifican proteínas quiméricas insecticidas novedosas. Las secuencias de polinucleótidos resultantes se clonaron en un vector plásmido de expresión de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Tras la confirmación de la secuencia de polinucleótidos, el plásmido de expresión se transformó en *Bt* y se expresó. Las preparaciones de las proteínas quiméricas novedosas expresadas se sometieron a ensayo para detectar actividad contra diversas plagas de lepidópteros.

Se produjeron muchas secuencias de polinucleótidos que codifican proteínas quiméricas insecticidas, y se evaluaron en bioensayos. No todas las proteínas quiméricas insecticidas demostraron actividad. Sólo unas pocas proteínas quiméricas insecticidas se seleccionaron en función de su actividad con lepidópteros específicos demostrada en el bioensayo. Las variantes de aminoácidos en las cuales se introdujeron sustituciones de aminoácidos o dominios alternativos protoxina y también se produjeron en función de las proteínas quiméricas insecticidas TIC867 y TIC868. Los componentes de las proteínas quiméricas insecticidas (dominios I, II y III y la protoxina) de la presente invención se presentan

en la Tabla 1. También se presentan las sustituciones de aminoácidos en las variantes de TIC868 con relación a la secuencia de proteínas TIC868 original.

Tabla 1. Proteínas quiméricas pesticidas novedosas y sus componentes.

5

Toxina	SEQ ID NO. de PRT	Dom1	Dom2	Dom3	Protoxina	Modificacion es de aminoácidos*
TIC1100	4	Cry1Ah	Cry1Ac	Cry1Ca	Cry1Ac	
TIC860	7	Cry1Bb1	Cry1Bb1	Cry1Ca	Cry1Ac	
TIC867	10	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ka	Cry1Ab3	
TIC867_20	13	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ka	Cry1Da1	
TIC867_21	16	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ka	Cry4	
TIC867_22	19	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ka	Cry9	
TIC867_23	21	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ka	Cry1Be	
TIC867_24	23	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ka	Cry1Ka	
TIC867_25	25	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ka	Cry1Ca	
TIC868	28	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ca	Cry1Ab3	
TIC868_9	30	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ca	Cry1Ab3	N240S_Y343 Q_N349T
TIC868_10	33	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ca	Cry1Da1	
TIC868_11	36	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ca	Cry4	
TIC868_12	39	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ca	Cry9	
TIC868_13	41	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ca	Cry1Be	
TIC868_14	43	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ca	Cry1Ka	

Toxina	SEQ ID NO. de PRT	Dom1	Dom2	Dom3	Protoxina	Modificacion es de aminoácidos*
TIC868_15	45	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ca	Cry1Ca	
TIC868_29	47	Cry1Be2	Cry1Be2	Cry1Ca	Cry1Ab3	Q136Y_Y343 Q_N349T
TIC869	50	Cry1Ja1	Cry1Ja1	Cry1Jx	Cry1Ab3	
TIC836	53	Cry1Fa1	Cry1Fa1	Cry1Ab	Cry1Ac	

*Las mutaciones de aminoácidos se identifican mediante el uso del código de aminoácidos IUPAC estándar. Ver la comisión conjunta IUPAC-IUB sobre nomenclatura bioquímica. Nomenclatura y simbolismo de aminoácidos y péptidos. Eur. J. Biochem. 138:9-37(1984). La primera abreviación de secuencia de aminoácidos indica el aminoácido original en la proteína de andamiaje dada, el número representa la posición del aminoácido y la segunda abreviación de secuencia de aminoácidos indica el aminoácido colocado en esa posición en la proteína variante mejorada.

EJEMPLO 2

Las proteínas quiméricas insecticidas novedosas demuestran actividad contra plagas de lepidópteros

5

Este Ejemplo ilustra la evaluación de las proteínas quiméricas insecticidas descritas en el Ejemplo 1 y la actividad de lepidópteros observada para las proteínas quiméricas insecticidas.

10 Las secuencias de polinucleótidos que codifican proteínas quiméricas insecticidas se expresaron en *Bt*. Las proteínas quiméricas insecticidas expresadas se evaluaron luego contra una variedad de lepidópteros conocidos como plagas de maíz, caá de azúcar, soja y algodón, así como otras plantas de cultivo. Específicamente, las proteínas insecticidas se evaluaron para detectar actividad

15 contra la oruga de las leguminosas (VBC, *Anticarsia gemmatalis*), barrenador de la caña de azúcar (SCB, *Diatraea saccharalis*), gusano perforador del brote (LSCB, *Elasmopalpus lignosellus*), gusano elotero (CEW, *Helicoverpa zea*), gusano bellotero (TBW, *Heliothis virescens*), lagarta verde (SBL, *Chrysodeixis includens*), gusano soldado africano (BLAW, *Spodoptera cosmioides*), gusano meridional (SAW,

20 *Spodoptera eridania*), cogollero del maíz (FAW, *Spodoptera frugiperda*), gusano soldado (BAW, *Spodoptera exigua*), gusano cogollero (OBW, *Helicoverpa armigera*), gusano gris del tabaco (OLW, *Spodoptera litura*), gusano rosado (PBW, *Pectinophora gossypiella*), gusano cortador grasiento (BCW, *Agrotis ipsilon*), barrenador del maíz (SWCB, *Diatraea grandiosella*), gusano moteado (SBW, *Earias*

25 *vitella*) y taladro del maíz (ECB, *Ostrinia nubilalis*). El gusano elotero (CEW, *Helicoverpa zea*) también se denomina gusano de la vaina de la soja (SPW) y gusano del algodón (CBW). La actividad se determinó a través de una combinación de puntajes de mortalidad y enlentecimiento, así como puntajes MIC50. MIC50 se refiere a una concentración de inhibición de muda, donde tanto las larvas muertas

30 como las larvas L1 (larvas que no mudaron a los segundos estadios) se factorizan en el puntaje. La Tabla 2 muestra la actividad de cada proteína quimérica insecticida. Un signo '+' indica actividad observada para la plaga de insectos específica.

Tabla 2. Actividad de bioensayo contra lepidópteros seleccionados.

Toxina	SEQ ID NO. de PRT	Insecto																
		V	S	LS	C		T	S	S	F	B	O	O	P	B		E	S
		B	C	CB	B	BL	B	B	A	A	A	B	L	B	C	SW	C	B
		C	B	CB	W	AW	W	L	W	W	W	W	W	W	W	CB	B	W
TIC1100	4	+	+			+			+		+		+	+				
TIC860	7	+	+	+		+	+	+	+	+	+		+	+		+		+
TIC867	10	+	+			+		+		+	+	+	+			+		
TIC867_20	13																	
TIC867_21	16				+													
TIC867_22	19				+					+								
TIC868	28	+	+			+		+		+	+		+	+		+		+
TIC868_10	33									+								
TIC868_11	36									+								
TIC868_12	39									+								
TIC869	50	+	+					+		+						+		
TIC836	53	+				+		+	+	+								

Tal como puede observarse en la Tabla 2 que antecede, la mayoría de las proteínas quiméricas insecticidas presentaron actividad contra una o más especies de plagas de lepidópteros.

EJEMPLO 3

Síntesis de genes que codifican proteínas quiméricas insecticidas y expresión en plantas

5

Este Ejemplo ilustra la síntesis de polinucleótidos que codifican las proteínas quiméricas insecticidas para la expresión en plantas.

Se construyeron secuencias sintéticas de codificación para su uso en la expresión de las proteínas quiméricas insecticidas en plantas. Las secuencias sintéticas se diseñaron y sintetizaron de acuerdo con métodos descritos generalmente en la patente estadounidense 5,500,365, evitando determinadas secuencias problemáticas perjudiciales, tales como secuencias de poliadenilación de plantas ricas en A/T y ATTTA, conservando al mismo tiempo la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica insecticida. Las secuencias de nucleótidos para estos genes que codifican las proteínas quiméricas insecticidas para su expresión en plantas se enumeran la Tabla 3.

Tabla 3. Secuencias de polinucleótidos que codifican proteínas quiméricas insecticidas diseñadas para su uso en plantas.

20

25

30

Proteína insecticida	SEQ ID NO. de ADN	SEQ ID NO. de PRT
TIC1100	2	4
TIC1100	3	4
TIC860	6	7
TIC867	9	10
TIC867_20	12	13

	TIC867_21	15	16
	TIC867_22	18	19
5	TIC867_23	20	21
	TIC867_24	22	23
	TIC867_25	24	25
	TIC868	27	28
10	TIC868_9	29	30
	TIC868_10	32	33
	TIC868_11	35	36
	TIC868_12	38	39
15	TIC868_13	40	41
	TIC868_14	42	43
	TIC868_15	44	45
	TIC868_29	46	47
20	TIC869	49	50
	TIC836	52	53

EJEMPLO 4

Casetes de expresión para la expresión de proteínas quiméricas insecticidas en plantas

Este Ejemplo ilustra la construcción de casetes de expresión que comprenden secuencias de polinucleótidos diseñadas para su uso en plantas que codifican proteínas quiméricas insecticidas.

Se construyó una variedad de casetes de expresión vegetales con las secuencias de polinucleótidos que codifican las proteínas quiméricas insecticidas diseñadas para la expresión vegetal proporcionadas en la Tabla 3. Dichos casetes de expresión son útiles para la expresión transitoria en protoplastos vegetales o la transformación de células vegetales. Los casetes de expresión típicos se diseñaron con respecto a la posible colocación de la proteína dentro de la célula. Un conjunto de casetes de expresión se diseñó de forma que permitiera que la proteína se tradujera y permaneciera en el citosol. Otro conjunto de casetes de expresión se diseñó para que tuviera un péptido de tránsito contiguo a la proteína de la toxina, para permitir el direccionamiento a un organelo de la célula, tal como el cloroplasto o plástido. Todos los casetes de expresión se diseñaron para comenzar en el extremo 5' con un promotor, que puede estar compuesto por múltiples elementos promotores, elementos potenciadores u otros elementos de expresión conocidos por los expertos en la técnica, unidos de manera operativa para potenciar la expresión del transgén. La secuencia promotora normalmente se encontraba seguida de forma contigua por una o más secuencias líder en la posición 3' con respecto al promotor. Una secuencia de intrones se proporcionó de forma usual en la posición 3' con respecto a la secuencia líder para mejorar la expresión del transgén. Una secuencia codificante de la toxina o péptido de tránsito y secuencia codificante de la toxina normalmente se ubicó en la posición 3' con respecto al promotor unido de manera operativa, configuración de líder e intrón. Una secuencia 3' UTR se proporcionó normalmente en la posición 3' con respecto a la secuencia codificante para facilitar la terminación de la transcripción y para proporcionar secuencias importantes para la poliadenilación de la transcripción resultante. Todos los elementos descritos anteriormente se unieron de manera operativa y se dispusieron de forma secuencial, a menudo con secuencias adicionales proporcionadas para la construcción del casete de expresión.

EJEMPLO 5

Actividad de lepidópteros de las proteínas quiméricas insecticidas en maíz transformado de forma estable

Este Ejemplo ilustra la actividad de inhibición presentada por las proteínas

quiméricas insecticidas contra plagas de lepidópteros cuando se expresan en plantas de maíz y se proporcionan como dieta para la plaga de insectos respectiva del maíz.

- 5 La variedad de maíz LH244 se transformó con vectores binarios de transformación descritos en el Ejemplo 4 mediante el uso de un método de transformación mediada por *Agrobacterium*. Las células transformadas se indujeron para formar plantas mediante métodos conocidos en la técnica. Los bioensayos que utilizan discos de hojas vegetales se llevaron a cabo de forma análoga a aquellos descritos en la
- 10 patente estadounidense n.º 8,344,207. Se utilizó una planta LH244 no transformada para obtener tejidos a utilizar como control negativo. Se evaluaron múltiples eventos de transformación de cada vector binario contra el gusano elotero (CEW, *Helicoverpa zea*), el cogollero del maíz (FAW, *Spodoptera frugiperda*), el gusano cortador grasiento (BCW, *Agrotis ipsilon*) y el barrenador del maíz (SWCB, *Diatraea grandiosella*).
- 15

El bioensayo en discos de hoja se llevó a cabo en plantas transgénicas de generación R₀ y F₁. Además, los puntajes de daño en la hoja se evaluaron para plantas transgénicas completas F₁ que expresan determinadas proteínas quiméricas

20 insecticidas infestadas con plagas de insectos lepidópteros. Los eventos transgénicos de F₁ que expresaban TIC860 y TIC868 también se evaluaron para detectar actividad en el campo contra FAW, CEW y SWCB. Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 4. Un signo '+' indica actividad observada para la plaga de insectos específica. Tal como puede observarse en la Tabla 4, la mayoría

25 de las proteínas quiméricas insecticidas y muchas de las variantes de proteínas quiméricas insecticidas demostraron actividad contra una o más especies de plagas de lepidópteros.

Tabla 4. Actividad de bioensayo para proteínas quiméricas insecticidas a partir de tejido de hojas de maíz transformado de forma estable

5			Insecto																
	Toxi na	SEQ ID NO. de PRT	VB C	SC B	LSC B	CE W SP W CB W	BLA W	TB W	SB L	SA W	FA W	BA W	OB W	OL W	PB W	BC W	SWC B	EC B	SB W
10	TIC1 100	4	+	+			+			+		+		+	+				
	TIC8 60	7	+	+	+		+	+	+	+	+	+		+	+		+		+
	TIC8 67	10	+	+			+		+		+	+	+	+			+		
15	TIC8 67_2 0	13	NT	NT	NT		NT	NT	NT	NT		NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	TIC8 67_2 1	16	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT		NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	TIC8 67_2 2	19	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
20	TIC8 67_2 1	16	NT	NT	NT		NT	NT	NT	NT		NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	TIC8 67_2 2	19	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	TIC8 68	28	+	+			+		+	+	+	+		+	+		+		+
25	TIC8 68_1 0	33	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	TIC8 68_1 1	36	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	TIC8 68_1 2	39	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

5

TIC8 69	50	+	+					+	+	+						+		
TIC8 36	53	+				+		+	+	+								

EJEMPLO 6

Actividad de lepidópteros de las proteínas quiméricas insecticidas en soja transformada de forma estable

10

Este Ejemplo ilustra la actividad de inhibición que presentaron las proteínas quiméricas insecticidas contra plagas de lepidópteros cuando se expresan en plantas de soja y se proporcionan como dieta para la plaga de insectos respectiva.

15

20

25

30

Las secuencias codificantes para las proteínas quiméricas insecticidas seleccionadas se rediseñaron para la expresión vegetal, se clonaron en un vector binario de transformación vegetal y se utilizaron para transformar células vegetales de soja. Los vectores de transformación vegetal comprendieron un primer casete de transgén para la expresión de la proteína quimérica insecticida tal como se describió en el Ejemplo 4 y un segundo casete de transgén para la selección de células vegetales transformadas mediante el uso de selección de espectinomicina. En algunas instancias, tal como en el caso de TIC1100, TIC860 y TIC836, una secuencia codificante de péptido de tránsito de cloroplasto se unió de manera operativa a la secuencia codificante quimérica insecticida. Se llevaron a cabo ensayos con TIC1100, TIC860 y TIC836 dirigidos y no dirigidos a plástidos. La Tabla 5 a continuación muestra la proteína quimérica insecticida y quimérica insecticida variante de TIC867 y las secuencias codificantes asociadas utilizadas para la expresión en soja transformada de forma estable.

Las células vegetales de soja se transformaron mediante el uso de los vectores binarios de transformación descritos anteriormente mediante transformación mediada por *Agrobacterium*. Las células vegetales transformadas resultantes se indujeron para formar plantas de soja completas. Se cosechó el tejido de hoja y se

utilizó en el bioensayo tal como se describió en el Ejemplo 5 o, de manera alternativa, se utilizó el tejido liofilizado en la dieta del insecto para bioensayo. El bioensayo se llevó a cabo contra FAW, gusano meridional (SAW, *Spodoptera eridania*), lagarta verde (SBL, *Chrysodeixis includens*), gusano elotero (SPW, *Helicoverpa zea*), oruga de las leguminosas (VBC, *Anticarsia gemmatalis*), gusano bellotero (TBW, *Heliothis virescens*), gusano soldado africano (BLAW, *Spodoptera cosmioides*), gusano perforador del brote (LSCB, *Elasmopalpus lignosellus*) y gusano gris del tabaco (OBW, *Helicoverpa armigera*).

La Tabla 5 muestra la actividad contra especies seleccionadas de lepidópteros para cada proteína insecticida en plantas de generación R₀ donde '+' indica actividad. Tal como puede observarse en la Tabla 5, cada una de las proteínas quiméricas insecticidas expresadas en la soja transformada de forma estable demostró actividad contra múltiples especies de lepidópteros. Cabe destacar en particular que la variante TIC867, TIC867_23, demostró actividad contra SPW.

Tabla 5. Actividad de bioensayo para proteínas quiméricas insecticidas a partir de tejido de hojas de soja R₀ transformado de forma estable

Proteína insecticida	FAW	SAW	SBL	SPW	VBC	TBW	BLAW	LSCB	OBW
TIC1100	+	+	+		+		+	+	+
TIC860	+	+	+		+			+	
TIC867	+	+	+		+	+		+	
TIC867_20		+	+						

5	TIC867_21		+	+					
	TIC867_22		+	+					
	TIC867_23	+	+	+	+				
	TIC867_24		+	+					
	TIC867_25		+	+					
10	TIC868	+		+		+		+	
	TIC869			+		+	+		+
	TIC836	+	+	+		+	+	+	+

15 Se permitió que los eventos transformados seleccionados se autopolinizaran y se cultivó la semilla resultante. El tejido de hoja se cosechó a partir de las plantas de generación R₁ y se utilizó en un bioensayo de alimentación. Las plantas R₁ que expresaban TIC1100, TIC860, TIC867, TIC868, TIC869 y TIC836 se evaluaron para detectar actividad contra SAW, SBL, SPW y VBC. La Tabla 6 muestra la actividad

20 observada en estas pruebas. Un signo '+' indica actividad observada para la plaga de insectos específica. Tal como se demuestra en la Tabla 6, la mayoría de las proteínas quiméricas insecticidas expresadas a partir de plantas de generación R₁ demostraron actividad contra una o más especies de lepidópteros.

25 **Tabla 6. Actividad de bioensayo para proteínas quiméricas insecticidas a partir de tejido de hojas de soja R₁ transformado de forma estable**

30	Toxina	SAW	SBL	SPW	VBC
	TIC1100	+	+		+
	TIC860	+	+		+
	TIC867	+			
	TIC868	+	+		+
	TIC869	+	+		+
	TIC836	+	+		+

La Tabla 7 demuestra los resultados de evaluaciones de campo llevadas a cabo en invernaderos con plantas de soja de generación R₁ transformadas de forma estable que expresaban TIC1100, TIC860 y TIC836. Las especies utilizadas para infestar plantas en los invernaderos incluyen SAW, SBL y SPW. La resistencia se definió como menor o igual a una defoliación del quince por ciento en las plantas de soja. La resistencia observada en estos ensayos es congruente con la resistencia observada en el ensayo de tejido de hoja de soja de generación R₁ presentada en la Tabla 6. Un signo '+' indica actividad observada para la plaga de insectos específica.

Tabla 7. Perfil de actividad de TIC1100, TIC860 y TIC836 expresado en soja de generación R₁ evaluada en pruebas de campo en invernadero

Toxina	SAW	SBL	SPW
TIC1100	+	+	
TIC860	+	+	
TIC836	+	+	

Las pruebas de campo en invernaderos con plantas de soja de generación R₁ transformadas de forma estable que expresaban TIC867 y TIC869 también se llevaron a cabo en dos ubicaciones distintas en Argentina, Acevedo y Fontezuela. Las especies utilizadas para infestar plantas en los invernaderos incluyen a la oruga bolillera (SABW, *Helicoverpa gelotopon*), VBC, BLAW, y oruga medidora (SFL, *Rachiplusia nu*). La resistencia se definió como menor o igual a una defoliación del quince por ciento en las plantas de soja. La Tabla 8 a continuación muestra la resistencia observada. Un signo '+' indica actividad observada para la plaga de insectos específica. Tal como se demuestra en la Tabla 8, las plantas de soja transgénicas que expresaban TIC867 demostraron resistencia a BLAW y VBC. Las plantas de soja transgénicas que expresaban TIC869 demostraron resistencia a SABW, SFL, BLAW y VBC.

Tabla 8. Perfil de actividad de TIC867 y TIC869 expresados en soja de generación R₁ evaluada en pruebas de campo en invernadero

	Acevedo			Fontezuela		
Toxina	SABW	SFL	VBC	SABW	BLAW	VBC
TIC867			+		+	+
TIC869		+	+	+	+	+

EJEMPLO 7

Actividad de lepidópteros de las proteínas quiméricas insecticidas en algodón transformado de forma estable

Este Ejemplo ilustra la actividad de inhibición que presentaron las proteínas quiméricas insecticidas contra plagas de lepidópteros cuando se expresan en plantas de algodón y se proporcionan como dieta para la plaga de insectos respectiva.

Las secuencias codificantes para las proteínas quiméricas insecticidas seleccionadas se rediseñaron para la expresión vegetal, se clonaron en un vector binario de transformación vegetal y se utilizaron para transformar células vegetales de algodón. Los vectores binarios resultantes fueron similares a aquellos descritos en el Ejemplo 4 y se utilizaron para expresar TIC860 dirigido y no dirigido al plástido (secuencia codificante: SEQ ID NO: 6; secuencia de proteínas: SEQ ID NO: 7), TIC867 (secuencia codificante: SEQ ID NO: 9; secuencia de proteínas: SEQ ID NO: 10), TIC868 (secuencia codificante: SEQ ID NO: 27; secuencia de proteínas: SEQ ID NO: 28) y TIC867_23 (secuencia codificante: SEQ ID NO: 20; secuencia de proteínas: SEQ ID NO: 23).

Las células vegetales de algodón se transformaron mediante un método de transformación mediada por *Agrobacterium*. Las células de algodón transformadas se indujeron para formar plantas completas. Se utilizó tejido de hoja de algodón en

el bioensayo según se describió en el Ejemplo 5 contra el gusano elotero (CBW, *Helicoverpa zea*), FAW, TBW y SBL. La Tabla 9 muestra la actividad observada contra estas especies de lepidópteros para TIC860, TIC867 y TIC868 en algodón de generación R₀ transformado de forma estable, donde '+' indica actividad. Tal como

5 puede observarse en la Tabla 9, TIC860, TIC867 y TIC868 demostraron actividad contra dos o más especies de plagas de lepidópteros en algodón de generación R₀ transformado de forma estable.

Tabla 9. Actividad de bioensayo de TIC860, TIC867 y TIC868 de tejido de hojas de algodón R₀ transformado de forma estable

Toxina	CBW	FAW	TBW	SBL
TIC860		+		+
TIC867	+	+	+	NT
TIC868		+		+

Los eventos de transformación seleccionados se utilizaron para producir semillas R₁. Las plantas R₁ que expresaban TIC860, TIC867 y TIC868 se evaluaron para

20 detectar resistencia a CBW, FAW, TBW y SBL. Se utilizaron en el ensayo tejidos de hoja, cuadrado y gorgojo. La Tabla 10 muestra la actividad observada en estas pruebas. Un signo '+' indica actividad observada para la plaga de insectos específica. Tal como se demuestra en la Tabla 10, TIC860 demostró actividad

25 contra FAW en el tejido de hoja. Además, la proteína quimérica insecticida TIC867 demostró actividad contra CBW y FAW en los tejidos de hoja, cuadrado y gorgojo, así como TBW y SBL en la hoja. La proteína quimérica insecticida TIC868 demostró actividad contra FAW en los tejidos de hoja, cuadrado y gorgojo, así como TBW y SBL en la hoja.

Tabla 10. Actividad de bioensayo para proteínas quiméricas insecticidas a partir de tejido de hojas de algodón R₁ transformado de forma estable

	CBW			FAW			TBW	SBL
Toxina	Hoja	Cuadrado	Gorgojo	Hoja	Cuadrado	Gorgojo	Hoja	Hoja
TIC860				+				
TIC867	+	+	+	+	+	+	+	+
TIC868				+	+	+	+	+

5

EJEMPLO 8

Clonación de secuencias codificantes de proteínas quiméricas insecticidas novedosas que presentan actividad contra lepidópteros

10

Las secuencias de ácido nucleico recombinante se construyeron a partir de genes de proteína Cry conocidos usados para producir secuencias codificantes que codifican proteínas quiméricas insecticidas novedosas. Las secuencias codificantes resultantes se clonaron en un vector plásmido de expresión de *Bacillus thuringiensis* (Bt). Tras la confirmación de la secuencia clonada, el plásmido de expresión se transformó en Bt y se expresó. Las preparaciones de las proteínas Cry quiméricas novedosas expresadas se sometieron a ensayo para detectar actividad contra diversas plagas de lepidópteros. Se produjeron muchas secuencias codificantes que codifican proteínas quiméricas insecticidas y se evaluaron en un bioensayo. No todas las proteínas quiméricas insecticidas demostraron actividad. Sólo unas pocas proteínas quiméricas insecticidas se seleccionaron en función de su actividad con lepidópteros específicos, y se presentan en la Tabla 11 a continuación.

20

Tabla 11. Proteínas quiméricas pesticidas novedosas y sus correspondientes secuencias de proteínas y secuencias codificantes bacterianas.

Proteína pesticida	SEQ ID NO de ADN bacteriano:	SEQ ID NO de proteína:
TIC713	54	55
TIC843	56	57
TIC862	58	59
TIC1099	60	61
TIC1103	78	79
TIC1101	80	81
TIC845	82	83
TIC846	84	85
TIC858	86	87
TIC865	88	89
TIC866	90	91
TIC838	92	93
TIC839	94	95
TIC841	96	97
TIC842	98	99
TIC850	100	101
TIC859	102	103
TIC861	104	105
TIC848	106	107

TIC849	108	109
TIC847	110	111

EJEMPLO 9

Las proteínas quiméricas insecticidas novedosas demuestran actividad contra plagas de lepidópteros

5

Las secuencias codificantes que codifican proteínas quiméricas insecticidas se expresaron en *Bt*. Las proteínas expresadas se evaluaron luego contra una variedad de lepidópteros conocidos como plagas de maíz, caña de azúcar, soja y algodón, así como otras plantas de cultivo. Las proteínas insecticidas se evaluaron para detectar actividad contra la oruga de las leguminosas (VBC, *Anticarsia gemmatilis*), barrenador de la caña de azúcar (SCB, *Diatraea saccharalis*), gusano perforador del brote (LSCB, *Elasmopalpus lignosellus*), gusano elotero (CEW, *Helicoverpa zea*), gusano bellotero (TBW, *Heliothis virescens*), lagarta verde (SBL, *Chrysodeixis* 10 *inclusens*), gusano soldado africano (BLAW, *Spodoptera cosmioides*), gusano meridional (SAW, *Spodoptera eridania*), cogollero del maíz (FAW, *Spodoptera frugiperda*), gusano soldado (BAW, *Spodoptera exigua*), gusano cogollero (OBW, *Helicoverpa armigera*), gusano gris del tabaco (OLW, *Spodoptera litura*), gusano rosado (PBW, *Pectinophora gossypiella*), gusano cortador grasiento (BCW, *Agrotis* 15 *ipsilon*), barrenador del maíz (SWCB, *Diatraea grandiosella*) y taladro del maíz (ECB, *Ostrinia nubilalis*). El gusano elotero (CEW, *Helicoverpa zea*) también se denomina gusano de la vaina de la soja (SPW) y gusano del algodón (CBW). La actividad se determinó a través de una combinación de puntajes de mortalidad y enlentecimiento, así como puntajes MIC50. MIC50 se refiere a una concentración de 20 inhibición de muda, donde tanto las larvas muertas como las larvas L1 (larvas que no mudaron a los segundos estadios) se factorizan en el puntaje. La Tabla 12 a continuación muestra la actividad de cada proteína quimérica insecticida. Un signo 25 '+' indica actividad observada para la plaga de insectos específica.

Tabla 12. Actividad del bioensayo contra lepidópteros seleccionados.

SEQ ID NO. de PRT	Insecto															
	VBC	SCB	LSCB	CEW SPW CBW	TBW	SBL	BLAW	SAW	FAW	BAW	OBW	OLW	PBW	BCW	SWCB	ECB
55	±	±	±	±	±	±	±		±	±	±	±	±		±	±
57	±	±	±	±	±	±	±			±		±	±		±	
59	±	±	±	±	±	±		±	±						±	
61	±	±		±		±	±		±	±	±	±	±		±	±
79	±	±		±	±	±	±			±	±	±	±	±	±	±
81	±	±				±	±									
83	±	±				±		±		±			±		±	
85	±	±				±		±				±				
87	±	±				±		±		±		±	±		±	
89	±	±	±		±	±	±	±	±						±	
91	±	±				±			±			±			±	
93	±	±	±		±	±										
95	±	±				±	±	±							±	
97	±	±				±	±						±		±	
99	±	±	±		±	±	±	±	±	±	±	±		±	±	
101	±					±	±	±	±	±		±		±	±	
103	±	±			±	±	±	±	±	±		±		±	±	
105	±	±				±		±							±	
107	±	±		±	±	±	±		±	±		±	±			
109	±	±		±	±	±	±		±	±		±	±			
111	±	±			±	±		±	±			±	±		±	

5 Tal como puede observarse en la Tabla 12 anterior, todas las proteínas quiméricas insecticidas presentaron actividad contra múltiples especies de lepidópteros.

EJEMPLO 10**Las variantes de aminoácidos de TIC1099 demuestran actividad contra lepidópteros**

5 La secuencia codificante para TIC1099 (SEQ ID NO:60) se modificó mediante métodos conocidos en la técnica para alterar aminoácidos específicos de la secuencia de proteína TIC1099 original (SEQ ID NO: 61). Las variantes resultantes se evaluaron para determinar la actividad contra lepidópteros seleccionados. La Tabla 13 a continuación muestra las variantes de TIC1099 y las SEQ ID NOs de proteína y ADN correspondientes.

Tabla 13. Variantes de TIC1099.

	Variante de TIC1099	SEQ ID NO de ADN:	SEQ ID NO de PRT:
15	TIC1099-T507E	62	63
	TIC1099-R522K	64	65
	TIC1099-K490S	66	67
	TIC1099-T562R	68	69
	TIC1099-S553R	70	71
	TIC1099-G498D	72	73
	TIC1099-K490A	74	75
20	TIC1099-E564A	76	77

Se evaluó cada variante para determinar la mortalidad y el enlentecimiento contra el cogollero del maíz (FAW, *Spodoptera frugiperda*), el gusano elotero (CEW, *Helicoverpa zea*), el gusano cortador grasiento (BCW, *Agrotis ipsilon*), la lagarta verde (SBL, *Chrysodeixis includens*), y el barrenador del maíz (SWCB, *Diatraea grandiosella*). La Tabla 14 a continuación muestra la actividad contra cada plaga de lepidóptero. La actividad se califica de '+' a '++++' en función del porcentaje de mortalidad.

Tabla 14. Actividad contra lepidópteros de variantes de TIC1099.

Variante de TIC1099	SEQ ID NO DE PRT:	FAW	CEW	BCW	SBL	SWCB
TIC1099	61	++++	+++	++++	++++	+++
TIC1099-T507E	63	++++	++++	++++	++++	++++
TIC1099-R522K	65	++++	++++	++++	+++	++++
TIC1099-K490S	67	++++	+++	++++	++	+
TIC1099-T562R	69	++++	++++	++++	++++	++++
TIC1099-S553R	71	++++	++++	++++	++++	++++
TIC1099-G498D	73	++++	++++	++++	++++	++++
TIC1099-K490A	75	++++	++++	++++	+++	+++
TIC1099-E564A	77	+++	++	+++	+	+

5 Todas las variantes de TIC1099 demostraron actividad contra las cinco especies de lepidópteros evaluadas. Algunas de las variantes demostraron una actividad menor en comparación con las otras para plagas específicas.

EJEMPLO 11

10 **Las proteínas quiméricas insecticidas expresadas en maíz transformado de manera estable demuestran actividad contra plagas de lepidópteros.**

15 Las secuencias codificantes sintéticas se construyeron para el uso en la expresión de la proteína codificada en plantas, se clonaron en un vector binario de transformación vegetal y se utilizaron para transformar células vegetales de maíz. Los vectores de transformación vegetal comprendieron un primer casete de transgén para la expresión de la proteína quimérica insecticida que comprendía un promotor constitutivo, unido de manera operativa en una posición 5' con respecto a un líder, unido de manera operativa en una posición 5' con respecto a un intrón, unido de manera operativa en una posición 5' con respecto a la secuencia

codificante de proteína quimérica insecticida, que a su vez estaba unida de manera operativa en una posición 5' con respecto a una 3' UTR; y un segundo casete de transgén para la selección de células vegetales transformadas mediante el uso de selección de glifosato. La Tabla 15 a continuación muestra las secuencias

5 codificantes de proteínas quiméricas insecticidas usadas para la expresión en maíz y las SEQ ID NOs correspondientes.

Tabla 15. Secuencias codificantes de proteínas insecticidas y SEQ ID NOs correspondientes.

10

<u>Proteína insecticida</u>	<u>SEQ ID NO de ADN:</u>	<u>SEQ ID NO de PRT:</u>
TIC713	112	55
TIC713	113	55
TIC843	114	57
TIC862	115	59
TIC1099	116	61
TIC1103	117	79
TIC845	118	83
TIC846	119	85
TIC858	120	87
TIC866	121	91
TIC838	122	93
TIC841	123	97
TIC842	124	99
TIC850	125	101
TIC859	126	103
TIC861	127	105

TIC848	128	107
TIC849	129	109
TIC847	130	111

La variedad de maíz LH244 se transformó con los vectores binarios de transformación descritos anteriormente mediante el uso de un método de transformación mediada por *Agrobacterium*. Las células transformadas se indujeron para formar plantas mediante métodos conocidos en la técnica. Los bioensayos que utilizan discos de hojas vegetales se llevaron a cabo de forma análoga a aquellos descritos en la patente estadounidense n.º 8,344,207. Se utilizó una planta LH244 no transformada para obtener tejidos a utilizar como control negativo. Se evaluaron múltiples eventos de transformación de cada vector binario contra el gusano elotero (CEW, *Helicoverpa zea*), el cogollero del maíz (FAW, *Spodoptera frugiperda*), el gusano cortador grasiento (BCW, *Agrotis ipsilon*) y el barrenador del maíz (SWCB, *Diatraea grandiosella*). Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 16 a continuación, donde '+' indica actividad.

Tabla 16. Actividad del bioensayo de proteínas quiméricas insecticidas de tejido de hojas de maíz transformado de manera estable.

<u>Proteína insecticida</u>	<u>CEW</u>	<u>FAW</u>	<u>BCW</u>	<u>SWCB</u>
TIC713	+	+		+
TIC843	+	+		+
TIC862	+	+		+
TIC1099	+	+	+	+
TIC1103	+	+		+
TIC845	+	+		+
TIC846	+	+		+
TIC858	+	+		+
TIC866	+	+		+

TIC838		+		+
TIC841	+	+		+
TIC842	+	+	+	+
TIC850	+	+		+
TIC859	+	+		+
TIC861	+	+		+
TIC848	+	+		+
TIC849	+	+		+
TIC847		+		+

Tal como puede observarse en la Tabla 16 anterior, todas las proteínas quiméricas insecticidas demostraron actividad contra dos o más especies de lepidópteros.

5

EJEMPLO 12

Las proteínas quiméricas insecticidas expresadas en soja transformada de manera estable demostraron actividad contra plagas de lepidópteros.

Las secuencias codificantes para proteínas quiméricas insecticidas seleccionadas se rediseñaron para la expresión vegetal, se clonaron en un vector binario de transformación vegetal y se utilizaron para transformar células vegetales de soja. Los vectores de transformación vegetal comprendieron un primer casete de transgén para la expresión de la proteína quimérica insecticida que comprendía un promotor constitutivo, unido de manera operativa en una posición 5' con respecto a un líder, unido de manera operativa en una posición 5' con respecto a la secuencia codificante de proteína quimérica insecticida, que a su vez estaba unida de manera operativa en una posición 5' con respecto a una 3' UTR; y un segundo casete de transgén para la selección de células vegetales transformadas mediante el uso de selección de espectinomicina. La Tabla 17 a continuación muestra las secuencias codificantes de proteínas quiméricas insecticidas usadas para la expresión en soja y las SEQ ID NOs correspondientes.

Tabla 17. Secuencias codificantes de proteínas insecticidas y SEQ ID NOs correspondientes.

5	<u>Proteína insecticida</u>	<u>SEQ ID NO de ADN:</u>	<u>SEQ ID NO de PRT:</u>
	TIC1103	117	79
	TIC866	121	91
10	TIC842	124	99
	TIC849	129	109

Las células vegetales de soja se transformaron mediante el uso de los vectores binarios de transformación descritos anteriormente mediante transformación mediada por *Agrobacterium*. Las células vegetales transformadas resultantes se indujeron para formar plantas de soja completas. Se cosechó el tejido de hoja y se utilizó en el bioensayo tal como se describió en el Ejemplo 11 o, de manera alternativa, se utilizó el tejido liofilizado en la dieta del insecto para bioensayo. El bioensayo se llevó a cabo contra el cogollero del maíz (FAW, *Spodoptera frugiperda*), el gusano meridional (SAW, *Spodoptera eridania*), la lagarta verde (SBL, *Chrysodeixis includens*), el gusano elotero (SPW, *Helicoverpa zea*), la oruga de las leguminosas (VBC, *Anticarsia gemmatilis*), la lagarta verde (SBL, *Chrysodeixis includens*), el gusano bellotero (TBW, *Heliothis virescens*), el gusano soldado africano (BLAW, *Spodoptera cosmioides*), el gusano meridional (SAW, *Spodoptera eridania*), el gusano perforador del brote (LSCB, *Elasmopalpus lignosellus*) y el gusano gris del tabaco (OBW, *Helicoverpa armigera*). La Tabla 18 a continuación muestra la actividad contra especies seleccionadas de lepidópteros para cada proteína insecticida en las plantas de generación R0.

Tabla 18. Actividad del bioensayo de proteínas quiméricas insecticidas de tejido de hojas de soja R1 transformada de manera estable.

Proteína insecticida	FAW	SAW	SBL	SPW	VBC	TBW	BLAW	SAW	LSCB	OBW
TIC1103		+	+	+	+	+			+	+
TIC866	+		+		+				+	+
TIC842	+	+	+		+	+	+	+	+	+
TIC849		+	+	+	+	+			+	

Tal como puede observarse en la Tabla 18, cada una de las proteínas quiméricas insecticidas expresadas en soja transformada de manera estable demostró actividad contra múltiples especies de lepidópteros.

- 5 Se permitió que los eventos transformados seleccionados se autopolinizaran y se cultivó la semilla resultante. El tejido de hoja se cosechó a partir de las plantas de generación R1 y se utilizó en un bioensayo de alimentación. La Tabla 19 muestra la actividad observada contra especies de lepidópteros seleccionadas a partir de proteínas insecticidas expresadas en el tejido de hoja de soja de generación R1.

10

Tabla 19. Actividad del bioensayo de proteínas quiméricas insecticidas de tejido de hojas de soja R1 transformada de manera estable.

15

Toxina	SAW	SBL	SPW	VBC
TIC1103		+	+	+
TIC866	+	+		+
TIC842		+	+	
TIC849		+	+	

20

Tal como puede observarse en la Tabla 19 anterior, las proteínas quiméricas insecticidas expresadas de plantas de generación R1 demostraron actividad para dos o más especies de lepidópteros.

25

- Todas las composiciones descritas y reivindicadas en la presente pueden realizarse y llevarse a cabo sin demasiada experimentación en vista de la presente descripción. Mientras que las composiciones de la presente invención se han descrito en términos de las modalidades ilustrativas que anteceden, será evidente para los expertos en la técnica que podrán aplicarse variaciones, cambios, modificaciones y alteraciones a la composición descrita en la presente, sin alejarse del concepto, espíritu y alcance verdaderos de la invención. Más específicamente, será evidente que los agentes descritos en la presente pueden sustituirse con determinados agentes que se relacionan de forma química y fisiológica, logrando los

30

mismos resultados o resultados similares. Todos los sustitutos similares y modificaciones evidentes para los expertos en la técnica se consideran dentro del espíritu, alcance y concepto de la invención, según se define en las reivindicaciones adjuntas.

5

Todas las publicaciones y documentos de patente publicados citados en la memoria descriptiva se incorporan a la presente mediante referencia, en la misma medida que si se indicara que cada publicación o solicitud de patente individual se incorpora mediante referencia.

10