

PROTEÍNAS INHIBIDORAS DE INSECTOS NOVEDOSAS

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[001] La presente solicitud reivindica el beneficio de las solicitudes provisionales de los Estados Unidos Nro. 63/219.604, presentada el 8 de julio de 2021, y 63/348.278, presentada el 2 de junio de 2022, las cuales se incorporan al presente documento en su totalidad como referencia.

INCORPORACIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

[002] El archivo denominado “MONS530WO.txt” que contiene un formato legible por ordenados del Listado de Secuencias se creó el 13 de junio de 2022. El archivo tiene 72.115 bytes (medidos en MS–Windows®), se presentó simultáneamente por vía electrónica (utilizando el sistema de presentación EFS–Web de la Oficina de Patentes de los Estados Unidos) y se incorporó en su totalidad como referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

[003] La invención generalmente se refiere al campo de proteínas inhibidoras de insectos. Se divulga una clase novedosa de proteínas de toxinas que exhibe actividad inhibidora de insectos contra las plagas de cultivos y semillas relevantes para la agricultura, particularmente las especies de Lepidópteros de plagas de insectos. Se proporcionan plantas, partes de plantas, semillas, células que incluyen células vegetales y microbianas, y vectores que contienen un constructo polinucleotídico recombinante que codifican una o más de las proteínas de toxinas divulgadas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[004] Mejorar el rendimiento de las cosechas de las plantas de importancia agrícola, incluyendo, entre otras, el maíz, la soja, la caña de azúcar, el arroz, el trigo, el algodón, las hortalizas, los mijos perlados, el guandú, el maní, la papa, la cebada, la avena, los árboles frutales y similares, ha adquirido una importancia creciente. Además de la necesidad creciente de productos agrícolas para alimentar, vestir y proporcionar energía a una población humana cada vez más numerosa, se prevé que los efectos relacionados con el clima y la presión de la población cada vez más numerosa para utilizar la tierra de forma distinta a las prácticas agrícolas reduzcan la cantidad de tierra cultivable disponible para la agricultura. Estos factores han llevado a pronósticos sombríos acerca de la

seguridad alimentaria, sobre todo en ausencia de mejoras importantes en la biotecnología vegetal y las prácticas agronómicas. En vista de estos factores, las mejoras ambientalmente sustentables en la tecnología, las técnicas agrícolas y el control de plagas son herramientas esenciales para ampliar la producción de cultivos en la cantidad cada vez más limitada de tierra cultivable disponible para la agricultura.

[005] Los insectos, particularmente los insectos dentro del orden de los Lepidópteros, son una de las mayores causas de daños a los campos de cultivo, reduciendo así el rendimiento de los cultivos en las áreas infectadas. Las especies de plagas de Lepidópteros que tienen un impacto negativo en la agricultura incluyen, pero no se limitan a, Oruga militar negra (*Spodoptera cosmioides*), Gusano cortador negro (*Agrotis ipsilon*), Gusano elotero (*Helicoverpa zea*), Gusano de la hoja de algodón (*Alabama argillacea*), Polilla del repollo (*Plutella xylostella*), Taladro del maíz (*Ostrinia nubilalis*), Gusano Cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), Gusano Cogollero del maíz resistente a Cry1Fa1 (*Spodoptera frugiperda*), Oruga del viejo mundo (*Helicoverpa armigera*), Oruga militar del sur (*Spodoptera eridania*), Gusano falso medidor (*Chrysodeixis includens*), Gusano manchado (*Earias vittella*), Barrenador del tallo (*Diatraea grandiosella*), Oruga medidora (*Rachiplusia nu*), Gusano bellotero (*Heliothis virescens*), Gusano oriental de la hoja (*Spodoptera litura*, también conocido como oruga del racimo), Gusano cortador occidental de la judía (*Striacosta albicosta*) e Isoca de las leguminosas (*Anticarsia gemmatilis*).

[006] Históricamente, la aplicación intensiva de insecticidas químicos sintéticos se utilizó como agente de control de plagas en la agricultura. Las preocupaciones sobre la salud ambiental y humana, además de los nuevos problemas de resistencia y el hecho de que tales agentes de control de plagas no discriminan y se dirigen también a los insectos beneficiosos y otros organismos, ha estimulado la investigación y el desarrollo de plaguicidas biológicos especialmente dirigidos a controlar las plagas que provocan la pérdida de los cultivos. Este esfuerzo de investigación condujo al descubrimiento y uso progresivo de diversas especies microbianas entomopatógenas, incluidas las bacterias.

[007] El paradigma de control biológico cambió cuando se descubrió y se desarrolló el potencial de las bacterias entomopatógenas, especialmente de las bacterias que pertenecen al gen *Bacillus*, como un agente de control de plagas biológico. Se han utilizado las cepas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) como una fuente de proteína plaguicida desde que se descubrió que las cepas *Bt* muestran una alta toxicidad contra insectos específicos. Se conoce que las cepas *Bt* producen

endotoxinas delta que están ubicadas dentro de los cuerpos de inclusión cristalina paraesporales al inicio de la esporulación y durante la fase de crecimiento estacionario (por ejemplo, las crioproteínas) y también se conoce que producen proteínas insecticidas secretadas. Tras la ingestión mediante un insecto susceptible, las endotoxinas delta, así como las toxinas secretadas, ejercen sus efectos en la superficie del epitelio del intestino medio, alterando la membrana celular, lo que lleva a la ruptura y muerte de la célula. También se han identificado a los genes que codifican las proteínas insecticidas en especies de bacterias distintas a las *Bt*, inclusive otras *Bacillus*, y una diversidad de especies de bacterias adicionales, tales como *Brevibacillus laterosporus*, *Lysinibacillus sphaericus* (“*Ls*”, conocida anteriormente como *Bacillus sphaericus*), especies *Pseudomonas* y *Paenibacillus lentimorbus*. Además, las toxinas insecticidas también han sido identificadas de una variedad de fuentes no bacterianas que incluyen helechos, venenos de arácnidos y la administración, en una dieta de una plaga, de ARNdc dirigido a la supresión de un gen esencial como una estrategia eficaz de administración de plagas.

[008] Las toxinas insecticidas solubles cristalinas y secretadas son altamente específicas para sus huéspedes y han ganado aceptación en todo el mundo como alternativas a los insecticidas químicos. Por ejemplo, las proteínas de toxina insecticida se han utilizado en diversas aplicaciones agrícolas para proteger las plantas de importancia agrícola de las infestaciones de insectos, han disminuido la necesidad de aplicaciones de plaguicidas químicos y han aumentado los rendimientos. Las proteínas de toxina insecticida se utilizan para controlar las plagas de importancia agrícola de plantas de cultivo mediante métodos mecánicos, tales como la pulverización para dispersar las formulaciones microbianas que contienen diversas cepas de bacterias a otras superficies de la planta y mediante el uso de técnicas de transformación genética para producir plantas transgénicas y semillas que expresen proteína(s) de toxina insecticida.

[009] El uso de plantas transgénicas que expresan proteínas de toxina insecticida se ha adaptado a nivel mundial. Por ejemplo, en 2016, se plantaron 23,1 millones de hectáreas con cultivos transgénicos que expresaban toxinas *Bt* y 75,4 millones de hectáreas con cultivos transgénicos que expresaban toxinas *Bt* apiladas con rasgos de tolerancia a herbicidas (ISAAA. 2016, *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. ISAAA Brief No. 52*. ISAAA: Ithaca, NY). El uso a nivel mundial de cultivos transgénicos protegidos contra insectos y el número limitado de proteínas de toxina insecticida utilizadas en dichos cultivos ha creado una presión de selección para los

alelos de insectos existentes que proporcionan resistencia a las proteínas insecticidas actualmente utilizadas.

[010] El desarrollo de la resistencia en las plagas objetivo a las proteínas de toxina insecticida crea la necesidad continua de descubrir y desarrollar nuevas formas de proteínas de toxina insecticida que sean útiles para gestionar el aumento de la resistencia de los insectos a los cultivos transgénicos que expresan proteínas de toxina insecticida. Las nuevas toxinas de proteínas con una eficacia mejorada y que exhiben un control sobre un espectro más amplio de especies de insectos susceptibles reducirá el número de insectos sobrevivientes que puedan desarrollar alelos de resistencia. Además, el uso en una planta de dos o más proteínas transgénicas de toxina insecticida tóxicas para la misma plaga de insectos y que muestra diferentes modos de acción o, alternativamente, dos o más modos de acción tóxica diferentes (por ejemplo, un transgén que codifica un ARNdc dirigido a un gen esencial para la supresión acoplada con un transgén que codifica un péptido o toxina de proteína, ambos tóxicos para la misma especie de insectos) reduce la probabilidad de resistencia en cualquier especie de insectos objetivo única. Adicionalmente, el uso de tecnologías de autolimitación como las que proporciona Oxitec Ltd, cuando se utilizan junto con las proteínas de la presente invención, deberían mejorar la durabilidad de los rasgos proporcionados a los cultivos transgénicos que expresan proteínas de la presente invención (Zhou, *et al.*, 2018. Combining the high-dose/refuge Strategy and self-limiting transgenic insects in resistance management—a test in experimental mesocosms. *Evol Appl* 11(5):727–738; Alphey, *et al.*, 2009. Combining pest control and resistance management: synergy of engineered insects with *Bt* crops. *Journal of Economic Entomology*, 102: 717–732).

[011] De esta manera, los inventores divulgan, en el presente documento, una proteína de *Bacillus thuringiensis* novedosa, junto con proteínas diseñadas mejoradas que exhiben secuencias de aminoácidos modificadas relativas a la toxina nativa y proteínas recombinantes ejemplares que, cada una, exhibe una actividad insecticida contra las especies de Lepidópteros objetivo, particularmente contra el Gusano cortador negro (*Agrotis ipsilon*), el Gusano elotero (*Helicoverpa zea*), el Gusano medidor falso (*Trichoplusia ni*), el Taladro del maíz (*Ostrinia nubilalis*), el Gusano Cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), la Oruga militar del sur (*Spodoptera eridania*), el Gusano falso medidor (*Chrysodeixis includens*), el Barrenador del tallo (*Diatraea grandiosella*), la Isoca de las leguminosas (*Anticarsia gemmatalis*), el Gusano cortador occidental de la judía

(*Striacosta albicosta*), así como las especies de Hemípteros chinche de las plantas (*Lygus lineolaris*) y la Chinche marrón neotropical (*Euschistus heros*).

SÍNTESIS DE LA INVENCION

5 [012] En el presente documento se divulga una proteína plaguicida novedosa, TIC2199, que exhibe actividad inhibitoria contra una o más plagas de plantas de cultivo. La proteína TIC2199 se puede utilizar sola o en combinación con otras proteínas insecticidas y agentes tóxicos en formulaciones e *in planta*, proporcionando así alternativas para las proteínas insecticidas y los químicos insecticidas que se utilizan actualmente en los sistemas agrícolas.

10 [013] En una forma de realización, en la presente solicitud se divulga una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un promotor heterólogo unido de forma operativa a un segmento polinucleotídico que codifica una proteína plaguicida o fragmento plaguicida del mismo, en donde la proteína plaguicida comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 2, 4, 7, 10, 13 o 17; o la proteína plaguicida comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al
15 menos un 96% o un 97%, o un 98% o un 99% o aproximadamente 100% de identidad de secuencia de aminoácidos con las SEQ ID NO: 2, 4, 7, 10, 13, 15 o 17; o el segmento polinucleotídico se hibrida en condiciones de hibridación estrictas con un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 16 o 18. La molécula de ácido nucleico recombinante puede comprender una secuencia que funciona para expresar la proteína plaguicida
20 en una planta y que, cuando se expresa en una célula vegetal produce una cantidad de proteína plaguicida eficaz o un fragmento plaguicida de la misma.

[014] En otra forma de realización de la presente solicitud, la molécula de ácido nucleico recombinante se encuentra presente en una célula huésped bacteriana o vegetal. Las células huésped bacterianas contempladas incluyen, al menos, los géneros *Agrobacterium*, *Rhizobium*,
25 *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Pantoea* y *Erwinia*. En determinadas formas de realización, la especie *Bacillus* es una *Bacillus cereus* o *Bacillus thuringiensis*, la *Brevibacillus* es una *Brevibacillus laterosporus*, o la *Escherichia* es una *Escherichia Coli*. Las células huésped vegetales incluyen una célula vegetal dicotiledónea y una célula vegetal monocotiledónea. Las células vegetales además incluyen las células vegetales de la
30 alfalfa, la banana, la cebada, las judías, el brócoli, el repollo, la brassica (por ejemplo, la canola), la zanahoria, la mandioca, el ricino, el coliflor, el apio, el garbanzo, el repollo chino, los cítricos,

el coco, el café, el maíz, el trébol, el algodón (esp. *Gossypium*), la cucurbitácea, el pepino, el abeto Douglas, la berenjena, el eucalipto, el lino, el ajo, las uvas, el lúpulo, el puerro, la lechuga, el pino Loblolly, el mijo, los melones, los frutos secos, la avena, las aceitunas, la cebolla, el ornamental, la palma, el pasto, los guisantes, el maní, el pimienta, el gandul, el pino, la papa, el álamo, la calabaza, el pino Radiata, el rábano, la colza, el arroz, los portainjertos, el centeno, el cártamo, el arbusto, el sorgo, el pino del Sur, la soja, la espinaca, la calabaza, la frutilla, la remolacha azucarera, la caña de azúcar, el girasol, el maíz dulce, la goma dulce, la batata, hierbas *switchgrass*, el té, el tabaco, el tomate, triticale, el césped, la sandía y el trigo.

[015] En otra forma de realización, la proteína plaguicida exhibe actividad contra los insectos Lepidópteros, incluidos, al menos, el Gusano cortador negro (*Agrotis ipsilon*), el Gusano elotero (*Helicoverpa zea*), el Gusano medidor falso (*Trichoplusia ni*), el Taladro del maíz (*Ostrinia nubilalis*), el Gusano Cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), la Oruga militar del sur (*Spodoptera eridania*), Gusano falso medidor (*Chrysodeixis includens*), el Barrenador del tallo (*Diatraea grandiosella*), el Gusano Barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis*), la Isoca de las leguminosas (*Anticarsia gemmatilis*), el Gusano cortador occidental de la judía (*Striacosta albicosta*) y el Barrenador menor del tallo (*Elasmopalpus lignosellus*).

[016] En otra forma de realización, la proteína plaguicida exhibe actividad contra los insectos Hemípteros, incluidos, al menos, la chinche de las plantas (*Lygus lineolaris*) y la chinche marrón neotropical (*Euschistus heros*).

[017] En la presente solicitud también se contemplan las bacterias, las plantas y las partes de las plantas que comprenden una molécula de ácido nucleico recombinante que codifican la proteína plaguicida TIC2199 o un fragmento de la misma. La molécula recombinante (por ejemplo, un constructo) puede comprender un promotor heterólogo para la expresión en células bacterianas o vegetales del segmento polinucleotídico unido de forma operativa que codifica la proteína plaguicida. Se contemplan ambas plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas. En otra forma de realización, además la planta además se selecciona del grupo que consiste en alfalfa, banana, cebada, judías, brócoli, repollo, brassica (por ejemplo, la canola), zanahoria, mandioca, ricino, coliflor, apio, garbanzo, repollo chino, cítricos, coco, café, maíz, trébol, algodón (esp. *Gossypium*), una cucurbitácea, pepino, abeto Douglas, berenjena, eucalipto, lino, ajo, uvas, lúpulo, puerro, lechuga, pino Loblolly, mijo, melones, frutos secos, avena, aceitunas, cebolla, ornamental, palma, pasto, guisantes, maní, pimienta, gandul, pino, papa, álamo, calabaza, pino Radiata, rábano, colza,

arroz, portainjertos, centeno, cártamo, arbusto, sorgo, pino del Sur, soja, espinaca, calabaza, frutilla, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, maíz, (es decir, maize), como el maíz dulce o el maíz de campo, goma dulce, batata, hierbas *switchgrass*, té, tabaco, tomate, triticale, césped, sandía y trigo. Las partes de las plantas pueden, por ejemplo, incluir, sin limitación, hojas, tubérculos, raíces, tallos, semillas, embriones, flores, inflorescencias, cápsulas, polen, frutos, alimento para animales y biomasa. También se contemplan partes de la planta procesadas, como madera o aceite, semillas molidas no viables o semillas fraccionadas, harina o almidón producidos a partir de las hojas, las flores, las raíces, las semillas o los tubérculos de la planta que contienen los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de la presente invención, y/o que contienen cantidades con eficacia plaguicida de las proteínas de toxina codificadas.

[018] En determinadas formas de realización, se divulgan semillas que comprenden las moléculas de ácido nucleico recombinante y cantidades con eficacia plaguicida de las proteínas de toxina TIC2199.

[019] En incluso otras formas de realización, se contempla una composición inhibidora de insectos que comprende las moléculas de ácido nucleico recombinante divulgadas en la presente solicitud. La composición inhibidora de insectos puede además comprender una secuencia de nucleótidos que codifica al menos otro agente plaguicida distinto a dicha proteína plaguicida. En determinadas formas de realización, el al menos un otro agente se selecciona del grupo que consiste en una proteína inhibidora de insectos, una molécula de ARNdc inhibidora de insectos y una proteína auxiliar. También se contempla que el al menos otro agente plaguicida en la composición inhibidora de insectos exhibe actividad contra una o más especies de plagas de las órdenes de Lepidópteros, Coleópteros o Hemípteros. El al menos otro agente plaguicida en la composición inhibidora de insectos se selecciona, en una forma de realización, del grupo que consiste en Cry1A, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B, Cry1C, variantes de Cry1C, Cry1D, Cry1E, Cry1F, quimeras de Cry1A/F, Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, Cry2A, Cry2Ab, Cry2Ae, Cry3, variantes de Cry3A, Cry3B, Cry4B, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry15, Cry34, Cry35, Cry43A, Cry43B, Cry51Aa1, ET29, ET33, ET34, ET35, ET66, ET70, TIC400, TIC407, TIC417, TIC431, TIC800, TIC807, TIC834, TIC853, TIC900, TIC901, TIC1201, TIC1415, TIC2160, TIC3131, TIC836, TIC860, TIC867, TIC869, TIC1100, VIP3A, VIP3B, VIP3Ab, AXMI-88, AXMI-97, AXMI-102, AXMI-112, AXMI-117, AXMI-100, AXMI-115, AXMI-113 y AXMI-005, AXMI134, AXMI-150, AXMI-171, AXMI-184, AXMI-196, AXMI-204, AXMI-207,

AXMI-209, AXMI-205, AXMI-218, AXMI-220, AXMI-221z, AXMI-222z, AXMI-223z, AXMI-224z and AXMI-225z, AXMI-238, AXMI-270, AXMI-279, AXMI-345, AXMI-335, AXMI-R1 y variantes del mismo, IP3 y variantes del mismo, DIG-3, DIG-5, DIG-10, DIG-657, proteína DIG-11, IDP102Aa y homólogos del mismo, IDP110Aa y homólogos del mismo, TIC868, Cry1Da1_7, BCW003, TIC1100, TIC867, TIC867_23, TIC6757. TIC7641, IDP072Aa, TIC5290, TIC3668, TIC3669, TIC3670, IDP072Aa e IDP103 y homólogos del mismo, PIP-50 y PIP-65 y homólogos de los mismos, PIP-83 y homólogos del mismo, y Cry1B.34; y las formas de realización de supresión génica mediada por ARNdc, incluyendo las dirigidas a la supresión de los genes de la especie Diabrotica Dv snf7 y Dv ssj1.

[020] También se contemplan productos básicos que comprenden una cantidad detectable de las moléculas de ácido nucleico y proteínas de toxinas divulgadas en la presente solicitud. Dichos productos básicos incluyen el maíz embolsado por un manipulador de granos, los copos de maíz, las tortas de maíz, la harina de maíz, la harina de maíz, el jarabe de maíz, el aceite de maíz, el ensilaje de maíz, el almidón de maíz, el cereal de maíz y similares, y los correspondientes productos básicos de soja, arroz, trigo, sorgo, gandul, maní, frutas, melón y hortalizas, incluidos, cuando proceda, jugos, concentrados, mermeladas, gelatinas, mermeladas y otras formas comestibles de dichos productos básicos que contengan una cantidad detectable de dichos polinucleótidos y/o polipéptidos de la presente solicitud, semillas de algodón enteras o procesadas, aceite de algodón, pelusa, semillas y partes de plantas procesadas para piensos o alimentos, fibra, papel, biomasa y productos de combustible como el combustible derivado del aceite de algodón o los gránulos derivados de los residuos de la desmotadora de algodón, semillas de soja enteras o procesadas, aceite de soja, proteínas de soja, harina de soja, harina de soja, copos de soja, salvado de soja, leche de soja, queso de soja, vino de soja, alimentos para animales que contengan soja, papel que contenga soja, crema que contenga soja, biomasa de soja y productos de combustible producidos con plantas de soja y partes de plantas de soja.

[021] En la presente solicitud también se contempla un método para producir semillas que comprenden moléculas de ácido nucleico recombinante y cantidades con eficacia plaguicida de la proteína de toxina codificada TIC2199. El método comprende plantar al menos una semilla que comprenda las moléculas de ácido nucleico recombinante divulgadas en la presente solicitud; cultivar una planta a partir de la semilla; y cosechar la semilla de la planta, en donde la semilla

cosechada comprende las moléculas de ácido nucleico recombinante a las que se hace referencia y/o las cantidades con eficacia plaguicida de la proteína de toxina codificada TIC2199.

[022] En otra forma de realización ilustrativa, se proporciona una planta resistente a la infestación de insectos Lepidópteros, en donde las células de dicha planta comprenden las moléculas de ácido nucleico recombinante divulgadas en el presente documento.

[023] En la presente solicitud también se divulgan métodos para controlar una plaga de las especies de Lepidópteros y controlar una infestación de plagas de especies de Lepidópteros en una planta, particularmente una planta de cultivo. El método comprende, en una forma de realización, en primer lugar poner en contacto la plaga con una cantidad insecticidamente eficaz de una proteína plaguicida como se establece en las SEQ ID NO: 2, 4, 7, 10, 13, 15 o 17; o poner en contacto la plaga con una cantidad insecticidamente eficaz de una o más proteínas plaguicidas que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 96%, o un 97%, o un 98% o un 99% o aproximadamente un 100% de identidad de secuencia de aminoácidos con las SEQ ID NO: 2, 4, 7, 10, 13, 15 o 17.

[024] En el presente documento además se proporciona un método para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico recombinante de la proteína de toxina TIC2199, en donde el método comprende poner en contacto una muestra de los ácidos nucleicos con una sonda de ácido nucleico que se hibrida en condiciones de hibridación estrictas con el ADN genómico de una planta que comprende un segmento polinucleotídico que codifica una proteína plaguicida o fragmento de la misma proporcionada en el presente documento, en donde la sonda es homóloga o complementaria a las SEQ ID NO: 3, 6, 9, 12, 14, 16 o 18, o una secuencia que codifica una proteína plaguicida que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 96%, o un 97%, o un 98% o un 99%, o aproximadamente un 100% de identidad de secuencia de aminoácidos con las SEQ ID NO: 2, 4, 7, 10, 13, 15 o 17; someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación estrictas; y detectar la hibridación de la sonda con el ADN de la muestra. En algunas formas de realización, una etapa de detección de la presencia de un miembro de la clase de la proteína de toxina TIC2199 puede comprender un ELISA o un western blot.

[025] En el presente documento también se proporcionan métodos para detectar la presencia de la proteína plaguicida o fragmento de la misma de la clase de la proteína de toxina TIC2199, en donde el método comprende poner en contacto una muestra con un anticuerpo inmunorreactivo o proteína recombinante de la clase de la proteína de toxina TIC2199 diseñados para detectar la

proteína TIC2199 y detectar la unión del anticuerpo a la proteína de la clase de la proteína de toxina TIC2199, confirmando así la presencia de la proteína en la muestra. En algunas formas de realización la etapa de detección comprende un ELISA o un Western blot.

5 [026] En la presente solicitud también se contempla un método para controlar una plaga o una infestación de plaga de la especie de Lepidópteros en un campo en donde el método comprende cultivar una planta de cultivo que expresa una cantidad insecticidamente eficaz de una proteína plaguicida como se establece en las SEQ ID NO: 2, 4, 7, 10, 13, 15 o 17; o cultivar una planta de cultivo que expresa una cantidad insecticidamente eficaz de una o más proteínas plaguicidas que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 96%, o un 97%, o un 98%, o un 10 99% o aproximadamente un 100% de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 2, 4, 7, 10, 13, 15 o 17; y liberar en el campo con cultivos que contienen un gen que codifica la proteína de toxina de la presente invención, uno o más plagas de las especies transgénicas de Lepidópteros, que llevan cada una de ellas un gen de autolimitación, con el fin de prevenir o retrasar la aparición de la resistencia de la una o más especies de plagas de lepidópteros a la proteína de toxina. En una forma 15 de realización las plantas de cultivo monocotiledóneas pueden ser maíz, trigo, sorgo, arroz, centeno o mijo. En incluso otra forma de realización, la planta de cultivo dicotiledónea puede ser soja, algodón o canola.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

20 [027] La SEQ ID NO: 1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína plaguicida TIC2199 obtenida de la especie EG8639 *Bacillus thuringiensis*.

[028] La SEQ ID NO: 2 es la secuencia de ácido nucleico de la proteína plaguicida TIC2199 codificada por la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 1.

25 [029] La SEQ ID NO: 3 es una secuencia codificadora sintética que codifica TIC2199 y es capaz de ser utilizada en una célula vegetal.

[030] La SEQ ID NO: 4 es una secuencia de aminoácido de una variante de TIC2199, TIC2199_3, en la cual los 44 aminoácidos del extremo N que comprenden un péptido de secreción han sido eliminados, y los 64 aminoácidos del extremo C también han sido eliminados.

30 [031] La SEQ ID NO: 5 es una secuencia de ADN que codifica la variante TIC2199_3 de la SEQ ID NO: 4.

[032] La SEQ ID NO: 6 es una secuencia codificadora sintética que codifica la variante TIC2199_3 de la SEQ ID NO: 4 y es capaz de ser utilizada en una célula vegetal.

[033] La SEQ ID NO: 7 es una secuencia de aminoácidos de una variante de TIC2199, TIC2199_1, en la cual los 44 aminoácidos del extremo N que comprenden un péptido de secreción han sido eliminados.

[034] La SEQ ID NO: 8 es una secuencia de ADN que codifica la variante TIC2199_1 de la SEQ ID NO: 7.

[035] La SEQ ID NO: 9 es una secuencia codificadora sintética que codifica la variante TIC2199_1 de la SEQ ID NO: 7 y es capaz de ser utilizada en una célula vegetal.

[036] La SEQ ID NO: 10 es una secuencia de aminoácidos de una variante de TIC2199, TIC2199_2, en la cual los 64 aminoácidos del extremo C también han sido eliminados.

[037] La SEQ ID NO: 11 es una secuencia de ADN que codifica la variante TIC2199_2 de la SEQ ID NO: 10.

[038] La SEQ ID NO: 12 es una secuencia codificadora sintética que codifica la variante TIC2199_2 de la SEQ ID NO: 10 y es capaz de ser utilizada en una célula vegetal.

[039] La SEQ ID NO: 13 es una secuencia de aminoácidos de la variante TIC2199_1 a la que se le ha eliminado la metionina inicial y se utiliza para unirla de forma operativa a un péptido de tránsito del cloroplasto.

[040] La SEQ ID NO: 14 es una secuencia codificadora sintética que codifica la variante TIC2199_1 a la cual se le ha eliminado el codón de metionina inicial y se utiliza para unirla de forma operativa a un péptido de tránsito del cloroplasto y es capaz de ser utilizada en una célula vegetal.

[041] La SEQ ID NO: 15 es una secuencia de aminoácidos de la variante TIC2199_2 a la cual se le ha eliminado la metionina inicial y se utiliza para unirla de forma operativa a un péptido de tránsito del cloroplasto.

[042] La SEQ ID NO: 16 es una secuencia codificadora sintética que codifica la variante TIC2199_2 a la cual se le ha eliminado el codón de metionina inicial y se utiliza para unirla de forma operativa a un péptido de tránsito del cloroplasto y es capaz de ser utilizada en una célula vegetal.

[043] La SEQ ID NO: 17 es una secuencia de aminoácidos de la variante de TIC2199_3 a la cual se le ha eliminado la metionina inicial y se utiliza para unirla de forma operativa a un péptido de tránsito del cloroplasto.

[044] La SEQ ID NO: 18 es una secuencia codificadora sintética que codifica la variante TIC2199_3 a la cual se le ha eliminado el codón de metionina inicial y se utiliza para unirla de forma operativa al péptido de tránsito del cloroplasto y es capaz de ser utilizada en una planta celular.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[045] Uno de los problemas en la técnica del control de plagas agrícolas se puede caracterizar como la necesidad de nuevas proteínas de toxinas que sean eficaces contra las plagas objetivo, que exhiban un amplio espectro de toxicidad contra las especies de plagas objetivo, sean capaces de ser expresadas en plantas sin provocar problemas agronómicos indeseables y que proporcione un modo de acción alternativo en comparación con las toxinas actuales que se utilizan comercialmente en plantas.

[046] En el presente documento se divulga una nueva proteína plaguicida ejemplificada por TIC2199. El uso de la proteína en cantidades con eficacia plaguicida puede abordar la infestación de insectos que son problemas en el arte, en particular contra un amplio espectro de plagas de insectos Lepidópteros y, más particularmente, contra el Gusano cortador negro (*Agrotis ipsilon*), el Gusano elotero (*Helicoverpa zea*), el Gusano medidor falso (*Trichoplusia ni*), el Taladro del maíz (*Ostrinia nubilalis*), el Gusano Cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), la Oruga militar del sur (*Spodoptera eridania*), Gusano falso medidor (*Chrysodeixis includens*), el Barrenador del tallo (*Diatraea grandiosella*), la Isoca de las leguminosas (*Anticarsia gemmatilis*), el Gusano cortador occidental de la judía (*Striacosta albicosta*), así como las especies de Hemípteros chinche de las plantas (*Lygus lineolaris*) y la Chinche marrón neotropical (*Euschistus heros*).

[047] En la presente solicitud, la referencia a TIC2199, “proteína TIC2199”, “toxina de proteína TIC2199”, “proteína plaguicida TIC2199”, “toxinas relacionadas con TIC2199”, “toxinas relacionadas con TIC2199”, “clase de la toxina de proteína TIC2199”, “clase de la toxina de proteína TIC2199” y similares, se refieren a cualquier proteína plaguicida o proteína inhibidora de insectos novedosa que comprende, consiste en, que es sustancialmente homóloga a, que es similar a, o que se deriva de cualquier proteína plaguicida o secuencia de proteína inhibidora de insectos

de TIC2199 (SEQ ID NO_ 2) y segmentos plaguicidas o inhibidores de insectos de las mismas, o combinaciones de las mismas que otorgan actividad en contra de las plagas de los Lepidópteros, inclusive toda proteína que exhiba actividad plaguicida o inhibidora de insectos si el alineamiento de dicha proteína con TIC2199 da como resultado una secuencia de aminoácidos de identidad de cualquier fracción porcentual de entre aproximadamente un 96% a aproximadamente un 100%. Las proteínas TIC2199 incluyen tanto la forma dirigida a los plástidos, como la forma no dirigida a los plástidos de las proteínas.

[048] El término “segmento” o “fragmento” se utiliza en la presente solicitud para describir secuencias consecutivas de aminoácidos o ácidos nucleicos que son más cortas que la secuencia completa de aminoácidos o ácidos nucleicos que describe una proteína TIC2199. En la presente solicitud también se divulga un segmento o fragmento que exhibe actividad inhibidora de insectos si el alineamiento de dicho segmento o fragmento con la sección correspondiente de la proteína TIC2199 indicada en la SEQ ID NO: 2 da como resultado una identidad de secuencia de aminoácidos de cualquier fracción porcentual de entre aproximadamente un 96% a aproximadamente un 100% entre el segmento o el fragmento y el segmento de aminoácidos dentro de la proteína TIC2199 correspondiente. Un fragmento como se describe en el presente documento puede comprender al menos 50, al menos 100, al menos 250, al menos 400, al menos 500, al menos 600 o al menos 800 residuos de aminoácidos contiguos de las proteínas TIC2199. Por ejemplo, un fragmento de la SEQ ID NO: 2 se presenta como SEQ ID NO: 4. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 comprende los Dominios I, II y III de TIC2199. Los 44 aminoácidos del extremo N del péptido de señalización de secreción propuestos se han eliminado en base a la alineación con otras proteínas plaguicidas CryII (Ruiz de Escudero, *et al.*, 2006. Molecular and Insecticidal Characterization of a CryII Protein Toxic to Insects of the Families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae, and Chrysomelidae. Applied and Environmental Microbiology, 72(7):4796–4804), reservando el residuo de metionina en el extremo N. Además, en la SEQ ID NO: 4 también se ha eliminado un dominio de protoxina carboxi-terminal escindido por tripsina predicho. Se predice que el sitio de escisión de la tripsina es la primera lisina (K) después de la secuencia “DRIEF” que está altamente conservada al final del Dominio III, bloque 5 cerca del comienzo del dominio de protoxina (Schnepf, *et al.*, 1998. Bacillus thuringiensis y sus proteínas cristalinas plaguicidas. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62(3): 775– 806). La SEQ ID NO: 4 puede ser codificada, por ejemplo,

por la SEQ ID NO: 5 para la expresión en bacterias, o por la SEQ ID NO: 6 para la expresión en una célula vegetal.

[049] Además, un fragmento de la SEQ ID NO: 2 se presenta como SEQ ID NO: 7. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 comprende los Dominios I, II y III de TIC2199. Los 44 aminoácidos del extremo N del péptido de señalización de secreción propuestos se han eliminado en base a la alineación con otras proteínas plaguicidas CryII. La SEQ ID NO: 7 puede ser codificada, por ejemplo, por la SEQ ID NO: 8 para la expresión en bacterias, o por la SEQ ID NO: 9 para la expresión en una célula vegetal. Un fragmento de la SEQ ID NO: 2 se presenta como SEQ ID NO: 10. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 comprende los Dominios I, II y III de TIC2199. En la SEQ ID NO: 10 también se ha eliminado un dominio de protoxina carboxi-terminal escindido por tripsina predicho. La SEQ ID NO: 10 puede ser codificada, por ejemplo, por la SEQ ID NO: 11 para la expresión en bacterias, o por la SEQ ID NO: 12 para la expresión en una célula vegetal. Un fragmento de la SEQ ID NO: 2 se presenta como SEQ ID NO: 13. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 comprende los Dominios I, II y III de TIC2199. Los 44 aminoácidos del extremo N del péptido de señalización de secreción propuestos se han eliminado en base a la alineación con otras proteínas plaguicidas CryII y carece de la metionina inicial. La SEQ ID NO: 13 se utiliza para unir de forma operativa la secuencia de aminoácidos TIC2199_1 al péptido de tránsito del cloroplasto. La SEQ ID NO: 13 está codificada por la SEQ ID NO: 14 para la expresión en una célula vegetal. Un fragmento de la SEQ ID NO: 2 se presenta como SEQ ID NO: 15. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 comprende los Dominios I, II y III de TIC2199. En la SEQ ID NO: 15 también se ha eliminado un dominio de protoxina carboxi-terminal escindido por tripsina predicho junto con la metionina inicial y se utiliza para unir de forma operativa la secuencia de aminoácidos TIC2199_2 a un péptido de tránsito del cloroplasto. La SEQ ID NO: 15 está codificada por la SEQ ID NO: 16 para la expresión en una célula vegetal. Los aminoácidos de la SEQ ID NO: 17 comprenden los Dominios I, II y III de TIC2199. Los 44 aminoácidos del extremo N del péptido de señalización de secreción propuestos se han eliminado en base a la alineación con otras proteínas plaguicidas CryII y también se ha eliminado EL dominio de protoxina carboxi-terminal escindido por tripsina predicho en la SEQ ID NO: 17 junto con la metionina inicial y se utiliza para unir de forma operativa la secuencia de aminoácidos TIC2199_3 a un péptido de tránsito del cloroplasto.

[050] La referencia en la presente solicitud a los términos “activo” o “actividad”, “actividad plaguicida” o “plaguicida” o “actividad insecticida”, “inhibidor de insectos”, “con eficacia plaguicida” o “insecticida” se refiere a la eficacia de un agente tóxico, como una toxina proteica, para inhibir (inhibir el crecimiento, la alimentación, la fecundidad o la viabilidad), suprimir (suprimir el crecimiento, la alimentación, la fecundidad o la viabilidad), controlar (controlar la infestación de la plaga, controlar las actividades de alimentación de la plaga en un cultivo particular) que contiene una cantidad eficaz de la proteína TIC2199 o eliminar (causando la morbilidad, la mortalidad o la fecundidad reducida de) una plaga. Estos términos pretenden incluir el resultado de proporcionar una cantidad con eficacia plaguicida de una proteína tóxica a una plaga en donde la exposición de la plaga a la proteína tóxica produce morbilidad, mortalidad, fecundidad reducida o atrofia. Estos términos también incluyen la repulsión de la plaga de una planta, de un tejido de la planta, de una parte de la planta, de las semillas, de las células vegetales o de la ubicación geográfica particular en donde se cultiva la planta, como resultado de proporcionar una cantidad con eficacia plaguicida de la proteína tóxica en o sobre la planta. En general, la actividad plaguicida se refiere a la capacidad de una proteína tóxica de ser eficaz en la inhibición del crecimiento, el desarrollo, la viabilidad, el comportamiento de alimentación, el comportamiento de apareamiento, la fecundidad o cualquier disminución medible en los efectos adversos provocados por la alimentación de un insecto. La proteína tóxica puede ser producida por la planta o se puede aplicar a la planta o al medioambiente dentro de la ubicación donde se encuentra la planta. Los términos “bioactividad”, “efectivo” o “eficaz”, o variaciones de los mismos, también son términos utilizados indistintamente en la presente solicitud para describir los efectos de las proteínas de la presente invención en plagas de insectos objetivo.

[051] Una cantidad con eficacia plaguicida de un agente tóxico, cuando se proporciona en la dieta de una plaga objetivo, exhibe actividad plaguicida cuando el agente tóxico entra en contacto con la plaga. Un agente tóxico puede ser una proteína plaguicida o uno o más agentes químicos conocidos en la técnica. Los agentes químicos plaguicidas o insecticidas se pueden utilizar solos o combinados entre sí. Los agentes químicos incluyen, pero no se limitan a, las moléculas de ARNdc que se dirigen a genes específicos para suprimirlos en una plaga objetivo, los organoclorados, los organofosforados, los carbamatos, los piretroides, los neonicotinoides y los rianoides. Los agentes proteicos plaguicidas o insecticidas incluyen las toxinas proteicas que se establecen en la presente solicitud, así como otros agentes tóxicos proteínicos que incluyen

aquellos que se dirigen a los Lepidópteros, así como toxinas proteicas que se utilizan para controlar otras plagas de plantas tales como las proteínas Cry, Vip y Cyt, las proteínas tóxicas para insectos de Pseudomonas y proteínas de toxinas de insectos derivadas de las especies de helechos que se encuentran disponibles en la técnica para su uso en el control de las especies de Coleópteros, Hemípteros y Homópteros.

[052] Se pretende que la referencia a una plaga, particularmente a una plaga de una planta de cultivo, signifique plagas de insectos de plantas de cultivo, particularmente aquellas plagas de insectos Lepidópteros controlados por la clase de toxina proteica TIC2199. Sin embargo, la referencia a una plaga también puede incluir a los insectos Coleópteros, los Hemípteros (por ejemplo, la chinche de las plantas (*Lygus lineolaris*)) y la chinche apestosa marrón neotropical (*Euschistus heros*) y los Homópteros que son plagas de las plantas, así como los nematodos y los hongos cuando los agentes tóxicos dirigidos a estas plagas están colocalizados o presentes junto con la proteína TIC2199 o una proteína que es entre el 95 y aproximadamente el 100 por ciento idéntica a la proteína TIC2199. Las expresiones “presentes junto” o “colocalizado” pretenden incluir cualquier caso en el que una plaga de insectos objetivo haya entrado en contacto con una proteína de toxina TIC2199, así como cualquier otro agente tóxico también presente en una cantidad con eficacia plaguicida en relación con la plaga de insectos objetivo. “En contacto” se refiere, en determinadas formas de realización, a la presencia en la dieta de la plaga objetivo y la dieta es consumida por la plaga objetivo.

[053] Los insectos de la orden de los Lepidópteros incluyen, pero no se limitan a los gusanos militares, los gusanos cortadores, las orugas y los heliotinos de la Familia Noctuidae, por ejemplo, Cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), el Gusano Soldado (*Spodoptera exigua*), la Oruga militar negra (*Spodoptera cosmioides*), la Oruga militar del sur (*Spodoptera eridania*), el Gusano del repollo (*Mamestra configurata*), Gusano cortador negro (*Agrotis ipsilon*), el Gusano medidor falso (*Trichoplusia ni*), el Barrenador del tallo (*Diatraea grandiosella*), el Gusano falso medidor (*Pseudoplusia includens*), la Oruga medidora (*Rachiplusia nu*), la Isoca de las leguminosas (*Anticarsia gemmatalis*), el Gusano verde del trébol (*Hypena scabra*), el Gusano bellotero (*Heliothis virescens*), el Gusano graneado (*Agrotis subterranea*), la Oruga militar verdadera (*Pseudaletia unipuncta*), la Oruga medidora (*Rachiplusia nu*), la Oruga bolillera (*Helicoverpa gelotopoeon*), el Gusano cortador del oeste (*Agrotis orthogonia*); barrenadores, portadores de cajas, gusanos de la telaraña, gusanos de la bolsa y esqueleto de la familia Pyralidae, por ejemplo,

el Taladro del maíz (*Ostrinia nubilalis*), la Polilla de la naranja Navel (*Amyelois transitella*), la Oruga tejedora de la raíz del maíz (*Crambus caliginosellus*), el Gusano tejedor del césped (*Herpetogramma licarsisalis*), la Polilla del girasol (*Homoeosoma electellum*), el Barrenador menor del tallo (*Elasmopalpus lignosellus*); enrolladores de hojas, gusanos de las yemas, gusanos de semilla y gusanos de frutos de la familia Tortricidae, por ejemplo, la Polilla de la manzana (*Cidia Pomonella*), la Polilla del racimo de la vid (*Endopiza viteana*), el Gusano del brote duraznero (*Grapholita molesta*), la Polilla del girasol (*Suleima helianthana*); y muchos otros Lepidópteros económicamente importantes, por ejemplo, la Palomilla de dorso de diamante (*Plutella xylostella*), el Gusano rosado del algodón (*Pectinophora gossypiella*) y la Lagarta peluda (*Lymantria dispar*). Otras plagas de insectos del orden de los Lepidópteros incluyen, por ejemplo, la Oruga de la hoja del algodón (*Alabama argillacea*), el Gusano enrollador de la hoja (*Archips argyrospila*), la Oruga cigarrera (*Archips Rosana*) y otras Especies de Archips, (*Chilo suppressalis*, barrenador asiático del arroz o barrenador del tallo del arroz), el Enrollador de la hoja del arroz (*Cnaphalocrocis medinalis*), la Oruga tejedora de la raíz del maíz (*Crambus caliginosellus*), la Oruga del pasto (*Crambus teterrellus*), el barrenador del tallo (*Diatraea grandiosella*), el Gusano Barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis*), la Oruga Espinosa del algodón (*Earias insulana*), el Gusano manchado (*Earias vittella*), el Gusano cogollero (*Helicoverpa armigera*), el Gusano elotero (*Helicoverpa zea*, también conocido como gusano de la vaina de la soja y gusano del algodón), el Gusano bellotero (*Heliothis virescens*), el Gusano tejedor del césped (*Herpetogramma licarsisalis*), el Gusano cortador occidental de la judía (*Striacosta albicosta*), la Pollila del racimo de la vid (*Lobesia botrana*), el Minador de las hojas de los cítricos (*Phyllocnistis citrella*), la Mariposa de la col (*Pieris brassicae*), la Mariposa de la col (*Pieris rapae*, también conocida como gusano del saco importado), el Gusano soldado (*Spodoptera exigua*), la Oruga negra (*Spodoptera litura*, también conocida como oruga del racimo) y la Polilla del tomate (*Tuta absoluta*).

[054] Los insectos del orden de Hemípteros incluyen, pero no se limitan a, chinches de la familia Pentatomidae: Chinches verdes del género *Chinavia* (*Chinavia hilaris*, *Chinavia marginata* y *Chinavia pensylvanica*), chinches del género *Chlorochroa* (*Chlorochroa granulose*, *Chlorochroa kanei*, *Chlorochroa ligata*, *Chlorochroa lineate*, *Chlorochroa opuntiae*, *Chlorochroa persimilis*, *Chlorochroa rossiana*, *Chlorochroa sayi*, *Chlorochroa uhleri*, *Chlorochroa belfragii*, *Chlorochroa faceta*, *Chlorochroa asborni*, *Chlorochroa saucia* y *Chlorochroa senilis*), Chinche

hedionda (*Nezara viridula*), chinches del género *Edessa* (*Edessa meditabunda*, *Edessa bifida* y *Edessa florida*), la chinche marrón (*Euschistus heros*), chinches del género *Euschistus* (*Euschistus acuminatus*, *Euschistus biformis*, *Euschistus conspersus*, *Euschistus crenator*, *Euschistus egglestoni*, *Euschistus ictericus*, *Euschistus inflatus*, *Euschistus latimarginatus*, *Euschistus obscures*, *Euschistus politus*, *Euschistus quadrator*, *Euschistus sevus*, *Euschistus strenuous*, *Euschistus tristigmus* y *Euschistus variolarius*), la Chinche apestosa marrón (*Halyomorpha halys*), la Chinche roja (*Thyanta accerra*), las chinches del género *Thyanta* (*Thyanta calceata*, *Thyanta custator*, *Thyanta pallidovirens*, *Thyanta perditor*, *Thyanta maculate* y *Thyanta pseudocasta*), la Chinche de abdomen verde (*Dichelops melacanthus*) y otras chinches del género *Dichelops* (*Dichelops avilapiresi*, *Dichelops bicolor*, *Dichelops dimidatus*, *Dichelops furcatus*, *Dichelops furcifrons*, *Dichelops lobatus*, *Dichelops miriamae*, *Dichelops nigrum*, *Dichelops peruanus*, *Dichelops Phoenix* y *Dichelops saltensis*), la Chinche de la alfalfa (*Piezodorus guildinni*), así como la *Piezodorus lituratus*; e insectos de la familia Plataspidae tales como la Chinche de las leguminosas (*Megacopta cribari* a), la Chinche opaca de las plantas (*Lygus hesperus*) o la Chinche opaca de las plantas (*Lygus lineolaris*).

[055] En la presente solicitud la referencia a una “molécula de ADN aislada” o un término o expresión equivalente, significa que la molécula de ADN es una que se encuentra presente sola o en combinación con otras composiciones, pero no dentro de su entorno natural. Por ejemplo, los elementos de ácido nucleico tales como una secuencia codificadora, una secuencia de intrones, una secuencia líder no traducida, una secuencia de promotores, una secuencia de terminación transcripcional, y similares, que se encuentran de forma natural dentro del ADN del genoma de un organismo no se consideran “aislados” siempre y cuando el elemento se encuentre dentro del genoma del organismo y que la ubicación dentro del genoma en la que se encuentra de forma natural. Sin embargo, cada uno de estos elementos y subpartes de estos elementos, estarían “aislados” dentro del alcance de la presente divulgación, siempre y cuando el elemento no se encuentre dentro del genoma del organismo y en la ubicación dentro del genoma en el cual se encuentra de forma natural. Similarmente, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína insecticida o cualquier variante insecticida de origen natural de esa proteína sería una secuencia de nucleótidos aislada siempre y cuando la secuencia de nucleótidos no se encuentre dentro del ADN de la bacteria donde se encuentra de forma natural la secuencia que codifica la proteína. Una secuencia de nucleótidos sintética que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína

insecticida de origen natural se consideraría aislada a los fines de la presente divulgación. A los fines de la presente divulgación, cualquier secuencia de nucleótidos transgénica, 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 extracromosomal, sería considerada una secuencia de nucleótidos aislada ya sea si se encuentra presente dentro del plásmido o una estructura similar utilizada para transformar las células, dentro del genoma de la planta o de la bacteria, o si se encuentra presente en cantidades detectables en los tejidos, la progenie, las muestras biológicas o los productos básicos derivados de la planta o de la bacteria.

[056] En la presente solicitud la referencia del término “gen de autolimitación” se refiere a un gen que limita la supervivencia del huésped, dando como resultado una reducción en la población huésped. Oxitech Ltd ofrece dicha tecnología. Los insectos transgénicos machos que llevan un gen de autolimitación se liberan y reproducen con hembras salvajes. Como resultado, la progenie hereda una copia del gen de autolimitación. El gen de autolimitación altera el funcionamiento apropiado de las células de los insectos al sobreproducir una proteína en ellos, lo que interfiere con la capacidad de las células de producir otras proteínas esenciales necesarias para su desarrollo. Al alterar el desarrollo normal de los insectos, el gen previene que sobreviva a la adultez. Por ejemplo, Oxitech Ltd desarrolló la cepa OX4319L de autolimitación de la Polilla de dorso de diamante (*Plutella xylostella*) y lleva un gen que selecciona machos y utiliza secuencias del gen de determinación de género *doublesex* (*dsx*). El gen expresa el empalme alternado por sexo para diseñar la expresión específica para hembras de gen de autolimitación que previene la supervivencia de la cría de hembras más allá de la fase larvaria y permite la producción solamente de cohortes de polillas autolimitantes macho. Con el fin de facilitar la lectura de un gran número de machos para su liberación en las instalaciones de producción de la Polilla de dorso de diamante, la expresión de *dsx* específico para hembras dentro de la cepa OX4319L se representa mediante la adición de tetraciclina, o análogos adecuados, en el alimento de las larvas. OX4319L también expresa la proteína fluorescente, DsRed, para permitir el control efectivo de la presencia de esta cepa en el campo (Jin, *et al.*, 2013 Engineered female-specific lethality for control of pest Lepidoptera. ACS Synthetic Biology, 2: 160–166). Esta tecnología, cuando se aplica en el campo con plantas que contienen los genes tóxicos de la presente invención, puede retrasar o prevenir la aparición de resistencia de especies de plagas dirigidas al control mediante los genes de toxinas y

proteicos de la presente invención, proporcionando así una mayor durabilidad de cualquier producto vegetal que contiene los genes de toxina y proteicos de la presente invención.

[057] Como se describe más adelante en la presente solicitud, se descubrió un marco abierto de lectura (ORF, por su sigla en inglés) que codifica TIC2199 (SEQ ID NO: 1) en el ADN obtenido de la especie EG8639 *Bacillus thuringiensis*. Un bioensayo que utilizaba proteínas de TIC2199 derivadas de células huésped microbianas demostró actividad contra las especies de Lepidópteros Gusano cortador negro (BCW –por su sigla en inglés–, *Agrotis ipsilon*), Gusano elotero (CEW –por su sigla en inglés–, *Helicoverpa zea*), Gusano medidor falso (CLW –por su sigla en inglés–, *Trichoplusia ni*), Taladro del maíz (ECB –por su sigla en inglés–, *Ostrinia nubilalis*), Gusano Cogollero del maíz (FAW –por su sigla en inglés–, *Spodoptera frugiperda*), Oruga militar del sur (SAW –por su sigla en inglés–, *Spodoptera eridania*), Gusano falso medidor (SBL –por su sigla en inglés–, *Chrysodeixis includens*), Barrenador del tallo (SWC –por su sigla en inglés–, *Diatraea grandiosella*), Barrenador de la caña de azúcar (SCB –por su sigla en inglés–, *Diatraea saccharalis*), Isoca de las leguminosas (VBC –por su sigla en inglés–, *Anticarsia gemmatilis*), Gusano cortador occidental de la judía (WBC –por su sigla en inglés–, *Striacosta albicosta*), así como las especies de Hemípteros chinche de las plantas (TPB –por su sigla en inglés–, *Lygus lineolaris*) y chinche marrón neotropical (NBSB –por su sigla en inglés–, *Euschistus heros*).

[058] Las secuencias codificadoras sintéticas diseñadas para utilizar en una planta vegetal se produjeron para que expresen TIC2199 (SEQ ID NO: 3), TIC2199_1 (SEQ ID NO: 9 y 14), TIC2199_2 (SEQ ID NO: 12 y 16) y TIC2199_3 (SQ ID NO: 6 y 18), particularmente cuando están unidas de forma operativa/funcional a un promotor funcional de la planta y a otros elementos que funcionan en las plantas para mediar el nivel deseado y las propiedades espaciales para la expresión de la proteína. Las plantas de maíz que expresan TIC2199, TIC2199_1, TIC2199_2 y TIC2199_3 demostraron actividad eficaz contra las especies de Lepidópteros Taladro del maíz (ECB, *Ostrinia nubilalis*) y Barrenador del tallo (SWC, *Diatraea grandiosella*). En Brasil, las plantas de maíz que expresan TIC2199 fueron eficaces contra SCB y altamente eficaces contra LCSB.

[059] Para la expresión en células vegetales, la proteína TIC2199 (SEQ ID NO: 2, 4, 7, 10, 13, 15 o 17) se puede expresar y localizar en el citosol o dirigir a varias organelas de la célula vegetal. Por ejemplo, dirigir una proteína al cloroplasto puede dar como resultado un aumento en los niveles de proteína expresada en una planta transgénica, a la vez que se evita que se produzcan

desfenotipos si la toxina de la proteína expresada reacciona con la biología celular de forma inesperada. El direccionamiento también puede dar lugar a un aumento de la eficacia de la resistencia a las plagas en el evento transgénico. Un péptido diana o péptido de tránsito es una cadena peptídica corta (de 3 a 70 aminoácidos) que dirige el transporte de una proteína a una región específica de la célula, incluyendo el núcleo, la mitocondria, el retículo endoplásmico (ER, por su sigla en inglés), el cloroplasto, el apoplasto, el peroxisoma y la membrana plasmática. Algunos péptidos diana se escinden de la proteína mediante peptidasas de señalización luego de que se transporten las proteínas. Para dirigirse al cloroplasto, las proteínas contienen péptidos de tránsito que tienen aproximadamente 40–50 aminoácidos de longitud. Para descripciones del uso de los péptidos de tránsito del cloroplasto, véanse las Patentes de Estados Unidos Nro. 5.188.642 y 5.728.925. Muchas proteínas localizadas en el cloroplasto se expresan a partir de genes nucleares como precursores y se dirigen al cloroplasto mediante un péptido de tránsito del cloroplasto (CTP, por su sigla en inglés). Los ejemplos de dichos CTP aislados incluyen, pero no se limitan a, aquellos asociados con la subunidad pequeña (SSU, por su sigla en inglés) de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa, la ferredoxina, la ferredoxina oxidoreductasa, la proteína I y la proteína II del complejo de recolección de luz, la tiorredoxina F, la enolpiruvil shikimato fosfato sintasa (EPSPS, por su sigla en inglés), y los péptidos de tránsito descritos en la Patente de los Estados Unidos Nro. 7.193.133. Se ha demostrado *in vivo* e *in vitro* que las proteínas no cloroplásticas se pueden dirigir al cloroplasto mediante el uso de fusiones de proteínas con un CTP heterólogo y que el CTP es suficiente para dirigir una proteína al cloroplasto. La incorporación de un péptido de tránsito del cloroplasto adecuado, como el EPSPS CTP (CTP2) *Arabidopsis thaliana* (véase, Klee, *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 210:437–442, 1987) o el EPSPS CTP (CTP4) *Petunia hybrida* (véase della-Cioppa, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:6873–6877, 1986) ha demostrado que dirige las secuencias de proteínas EPSPS heterólogas a los cloroplastos en plantas transgénicas (véanse, las Patentes de los Estados Unidos Nro. 5.627.061, 5.633.435 y 5.312.910 y las EP 0218571, EP 189707, EP 508909 y EP 924299). Para dirigir la proteína de la toxina TIC2199 al cloroplasto, se coloca una secuencia que codifica un péptido de tránsito del cloroplasto 5' en enlace operable y en marco con una secuencia codificadora sintética que codifica la proteína de la toxina TIC2199 que ha sido diseñada para su expresión en células vegetales.

[060] Se contempla que se pueden crear secuencias de proteína de toxina adicionales a TIC2199 utilizando la secuencia de aminoácidos de TIC2199 para crear proteínas novedosas con

propiedades novedosas. La proteína de toxina TIC2199 se puede alinear para combinar las diferencias a nivel de la secuencia de aminoácidos en nuevas variantes de la secuencia de aminoácidos y realizar los cambios adecuados en la secuencia de ácido nucleico recombinante que codifica las variantes.

5 [061] Se contempla que las variantes mejoradas de la clase de la toxina de la proteína TIC2199 se puede diseñar *in planta* mediante el uso de varios métodos de edición de genes conocidos en la técnica. Dichas tecnologías utilizadas para la edición de genomas incluyen, pero no se limitan a, ZFN (nucleasas de dedos de zinc), meganucleasas, TALEN (nucleasas efectoras similares al activador de la transcripción) y sistemas CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y
10 regularmente espaciadas)/Cas (asociados a CRISPR). Estos métodos de edición de genomas se pueden utilizar para alterar la secuencia codificadora de la proteína de la toxina transformada dentro de una célula vegetal a una secuencia codificadora de la toxina diferente. Específicamente, mediante estos métodos, se pueden alterar uno o más codones dentro de la secuencia codificadora de la toxina para diseñar una nueva secuencia de aminoácidos proteica. Alternativamente, se puede
15 reemplazar o eliminar un fragmento dentro de la secuencia codificadora, o se pueden insertar fragmentos de ADN adicionales dentro de la secuencia codificadora para diseñar una nueva secuencia codificadora de la toxina. La nueva secuencia codificadora puede codificar una proteína de la toxina con nuevas propiedades tales como una actividad o un espectro mayor contra plagas de insectos, así como proporcionar actividad contra una o más especies de plagas de insectos en
20 las que se haya desarrollado o pueda surgir resistencia contra la proteína original de la toxina de insecto. La célula vegetal que comprende la secuencia codificadora de la toxina editada por el gen se puede utilizar por métodos conocidos en la técnica para generar plantas completas que expresen la nueva proteína de la toxina.

[062] También se contempla que los fragmentos de TIC2199 o variantes de la proteína de los
25 mismos pueden ser formas truncadas en donde se eliminan uno o más aminoácidos del extremo N, del extremo C, del medio de la proteína o de combinaciones de los mismos en donde los fragmentos y las variantes retienen la actividad inhibidora de los insectos. Estos fragmentos pueden ser de origen natural o variantes sintéticas de TIC2199 o variantes proteicas derivadas, pero deben retener, al menos, la actividad inhibidora de insectos de TIC2199.

30 [063] Las proteínas que se parecen a la proteína TIC2199 se pueden identificar y comparar entre sí utilizando varios algoritmos informáticos conocidos en la técnica. Las identidades de las

secuencias de aminoácidos indicadas en esta solicitud son el resultado de un alineamiento Clustal W que utiliza estos parámetros por defecto: Matriz de pesos: blosum, Penalización por apertura de huecos: 10,0, Pena de extensión de huecos: 0,05, Huecos hidrofílicos: On, Residuos hidrofílicos: GPSNDQERK, Penalizaciones por huecos específicos de los residuos: On (Thompson, *et al.*, (1994) Nucleic Acids Research, 22:4673–4680). El porcentaje de identidad de aminoácidos además se calcula por el producto de 100% multiplicado por (identidades de aminoácidos/longitud de la proteína en cuestión). Otros algoritmos de alineación también están disponibles en la técnica y proporcionan resultados similares a los obtenidos utilizando una alineación Clustal W y están contemplados en el presente documento.

[064] Se pretende que una proteína que muestra actividad inhibidora de insectos contra una especie de insectos Lepidópteros esté relacionada con TIC2199 si la proteína se utiliza en una consulta, por ejemplo en una alineación Clustal W, y las proteínas de la presente invención indicadas como SEQ ID NO: 2 o 4 se identifican como aciertos en dicho alineamiento en el que la proteína de consulta exhibe una identidad de aminoácidos de al menos el 96% a aproximadamente el 100% a lo largo de la longitud de la proteína de consulta que es de aproximadamente el 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, o cualquier porcentaje de fracción en este rango.

[065] Además del porcentaje de identidad, TIC2199 y las variantes de TIC2199 también se pueden relacionar por la estructura principal (motivos de aminoácidos conservados), por la longitud y por otras características. En la Tabla 1 se indican las características de TIC2199 y las variantes de la toxina de la proteína TIC2199.

Tabla 1. Características seleccionadas de la proteína de la toxina TIC2199

Proteína	Peso Mole- cular (en Daltones)	Longi- tud de amino- ácidos	Punto isoeléct- rico	Carga a un pH de 7,0	Nro. de amino- ácidos hidrofó- bicos	Nro. de amino- ácidos polares	Nro. de amino- ácidos fuertemen- te básicos (-)	Nro. De amino- ácidos fuertemen- te ácidos
TIC2199	81.338,45	719	7,1197	5,0	366	353	84	71
TIC2199 _1	76.323,99	675	7,0546	4,5	350	325	78	66

TIC2199 _2	73.702,01	655	8,3151	9,5	337	318	75	58
TIC2199 _3	68.687,34	611	8,4697	9,0	321	290	69	53

[066] Como se describe más adelante en los Ejemplos de la presente solicitud, se diseñó una secuencia de molécula de ácido nucleico sintética que codifica TIC2199 y variantes de TIC2199 para su uso en plantas, codificada por SEQ ID NO: 3, 6, 9, 12, 14, 16 y 18. En vista de la redundancia del código genético, está dentro de la habilidad de la técnica producir cualquier número de otras secuencias para codificar las proteínas de la toxina. Sin embargo, se entiende que las secuencias producidas para la expresión *in planta* deben evitar los problemas conocidos en la técnica que dificultan o limitan la expresión eficaz de la secuencia codificadora, en particular como se describe en la Patente de los Estados Unidos Nro. 5.500.365.

[067] Los casetes de expresión y los vectores que contienen una molécula de secuencia de ácido nucleico recombinante se pueden construir e introducir en las plantas, particularmente por ejemplo las células vegetales del maíz, la soja o el algodón, de acuerdo con los métodos de transformación y las técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la transformación mediada por *Agrobacterium* se describe en las Publicaciones de Solicitudes de Patentes de los Estados Unidos 2009/0138985^{a1} (soja), 2008/0280361^{a1}(soja), 2009/0142837^{a1} (maíz), 2008/0282432 (algodón), 2008/0256667 (algodón), 2003/0110531 (trigo), 2001/0042257 A1 (remolacha azucarera), las Patentes de los Estados Unidos Nro. 5.750.871 (canola), 7.026.528 (trigo) y 6.365.807 (arroz) y en Arencibia, *et al.* (1998), Transgenic Res. 7:213–222 (caña de azúcar), todos los cuales se incorporan al presente documento en su totalidad como referencia. Las células transformadas se pueden regenerar en plantas transformadas que expresan TIC2199 y demuestran actividad plaguicida mediante los bioensayos llevados a cabo en la presencia de larvas de plagas de Lepidópteros utilizando discos de hojas vegetales obtenidos de las plantas transformadas. Las plantas se pueden derivar de las células vegetales mediante técnicas de regeneración, semilla, polen o transformación de meristemas. Los métodos de transformación de plantas son conocidos en la técnica.

[068] Como una alternativa a los métodos de transformación tradicionales, una secuencia de ADN, por ejemplo un transgén, casete(s) de expresión, etc., se pueden insertar o integrar en un sitio específico o locus dentro del genoma de una planta o célula vegetal mediante la integración

dirigida al sitio. Lo(s) constructo(s) y las molécula(s) de ADN recombinante de la presente divulgación puede(n) incluir una secuencia de plantilla donante que comprenda al menos un transgén, un casete de expresión u otra secuencia de ADN para su inserción en el genoma de la planta o célula vegetal. Dicha plantilla donante para la integración dirigida al sitio puede además

5 incluir uno o dos brazos que flanquean una secuencia de inserción (es decir, la secuencia, el transgén, el casete, etc., para ser insertado en el genoma de la planta). Los constructos de ADN recombinante de la presente divulgación puede además comprender un(os) casete(s) de expresión que codifique(n) una nucleasa específica para el sitio y/o cualquier proteína(s) asociadas para llevar a cabo a integración dirigida al sitio. Estos casetes de expresión de nucleasa pueden estar

10 presentes en la misma molécula o vector que la plantilla donante (in cis) o en una molécula o vector separado (in trans). En la técnica se conocen diversos métodos para la integración dirigida al sitio que involucran diferentes proteínas (o complejos de proteínas y/o ARN guía) que cortan el ADN genómico para producir una rotura de doble cadena (DSB, por su sigla en inglés) o una mella en el sitio genómico o locus deseado. Brevemente, como se comprende en la técnica, durante el

15 proceso de reparación de la DSB o mella introducida en la enzima nucleasa, el ADN de plantilla donante se puede integrar al genoma en el sitio de la DSB o la mella. La presencia de brazos homólogos en la plantilla donante puede promover la adopción y direccionamiento de la secuencia de inserción en el genoma de la planta durante el proceso de reparación mediante una recombinación homóloga, aunque puede ocurrir a través de la unión de extremos no homólogos

20 (NHEJ, por su sigla en inglés). Los ejemplos de nucleasas específicas para el sitio que se pueden utilizar incluyen las nucleasas de dedos de zinc, las meganucleasas diseñadas o nativas, las endonucleasas TALE y las endonucleasas guiadas por ARN (por ejemplo, Cas9 o Cas12a). Para los métodos que utilizan nucleasas específicas de sitio guiadas por ARN (por ejemplo, Cas9 o Cas12a), la(s) construcción(es) de ADN recombinante también comprenderá(n) una secuencia que

25 codifica(n) uno o más ARN guía para dirigir la nucleasa al sitio deseado dentro del genoma de la planta.

[069] Las composiciones de molécula de ácido nucleico recombinante que codifican proteínas TIC2199 en bacterias y plantas se pueden expresar con constructos de ADN recombinante en los cuales una molécula polinucleotídica, como un promotor y cualquier otro elemento regulador

30 necesario para la expresión en el sistema para el sistema al cual se destina el constructo. Los ejemplos no limitantes incluyen un promotor funcional para plantas unido de forma operativa a

una proteína TIC2199 que codifica una secuencia para la expresión de la proteína en plantas o un promotor funcional para *Bt* unido de forma operativa a una proteína TIC2199 que codifica una secuencia para la expresión de la proteína en una bacteria *Bt* u otra especie *Bacillus*. Otros elementos que pueden estar unidos de forma operativa a la proteína TIC2199 que codifica una secuencia incluyen, pero no se limitan a, potenciadores, intrones, líderes no traducidos, etiquetas de inmovilización de la proteína codificada (etiqueta HIS), péptidos de translocación (es decir, péptidos de tránsito plastidial, péptidos de señalización), secuencias polipeptídicas para enzimas modificadoras postraduccionales, sitios de unión ribosómica y sitios objetivo de ARNi. Los ejemplos de las moléculas polinucleotídicas recombinantes proporcionados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, un promotor heterólogo unido de forma operativa a un polinucleótido como las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 16 o 18 que codifican TIC2199 o variantes truncadas de TIC2199 o una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos que se indica en las SEQ ID NO: 2, 4, 7, 10, 13, 15 o 17. Un promotor heterólogo también puede estar unido de operativa a una secuencia codificadora de ADN sintético que codifica una TIC2199 dirigida a pláستidos. Los codones de una molécula de ácido nucleico recombinante codificadores para las moléculas divulgadas en el presente documento pueden ser sustituidos por codones sinónimos (conocidos en la técnica como una sustitución silenciosa).

[070] Un constructo de ADN recombinante que comprende secuencias que codifican la proteína TIC2199 puede comprender además una región de ADN que codifica para uno o más agentes inhibidores de insectos que se pueden configurar para expresar concomitantemente o coexpresar con una secuencia de ADN que codifica una proteína TIC2199, una molécula de ARNdc inhibidora de insectos o una proteína auxiliar. Las proteínas auxiliares incluyen, pero no se limitan a, cofactores, enzimas, socios de unión u otros agentes que funcionan para ayudar a la eficacia de un agente inhibidor de insectos, por ejemplo, ayudando a su expresión, influyendo en su estabilidad en las plantas, optimizando la energía libre para la oligomerización, aumentando su toxicidad e incrementando su espectro de actividad. Una proteína auxiliar puede facilitar la ingesta de uno o más agentes inhibidores de insectos, por ejemplo, o potenciar los efectos tóxicos del agente tóxico.

[071] Un constructo de ADN recombinante se puede ensamblar de manera que todas las proteínas o moléculas de ARNdc se expresen a partir de un promotor o cada proteína o molécula de ARNdc esté bajo el control de un promotor separado o alguna combinación de los mismos. La proteína de la presente invención se puede expresar a partir de un sistema de expresión multigénico en el cual

la TIC2199 se expresa a partir de un segmento nucleotídico común que también contiene otros marcos de lectura abiertos y promotores, dependiendo del tipo del sistema de expresión seleccionado. Por ejemplo, un sistema de expresión multigénico de bacterias puede utilizar un único promotor para impulsar la expresión de marcos de lectura abiertos multienlazados/en tándem a partir de único operón (es decir, una expresión policistrónica). En otro ejemplo, un sistema de expresión multigénico de plantas puede utilizar casetes de expresión multidesenlazados o enlazados, donde cada casete expresa una proteína diferente u otro agente, como una o más moléculas de ARNdc.

[072] Los polinucleótidos recombinantes o constructos de ADN recombinantes que comprenden una secuencia codificadora de la proteína TIC2199 se pueden administrar a células huésped mediante vectores, por ejemplo, un vector, un baculovirus, un cromosoma sintético, un virión, un cósmido, un fagémido, un fago o un vector viral. Dichos vectores se pueden utilizar para lograr una expresión estable o transitoria de una secuencia codificadora de la proteína TIC2199 en una célula huésped o la expresión posterior del polipéptido codificado. En la presente solicitud se hace referencia a un polinucleótido recombinante exógeno o constructo de ADN recombinante que comprende una secuencia codificadora de la proteína TIC2199 y que se introduce en una célula huésped como un “transgén”.

[073] En el presente documento se proporcionan bacterias transgénicas, células vegetales transgénicas, plantas transgénicas y partes de plantas transgénicas que contienen un polinucleótido recombinante que expresa TIC2199 o una secuencia codificadora de la proteína de la toxina de la familia relacionada. El término “célula bacteriana” o “bacteria” puede incluir, pero no se limita a, una célula *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Brevibacillus*, *Klebsiella*, *Erwinia*, o *Rhizobium*. El término “célula vegetal” o “planta” puede incluir, pero no se limita a, una planta dicotiledónea o monocotiledónea. El término “célula vegetal” o “planta” puede incluir, pero no se limita a, células vegetales o plantas de alfalfa, banana, cebada, judías, brócoli, repollo, brassica (por ejemplo, la canola), zanahoria, mandioca, ricino, coliflor, apio, garbanzo, repollo chino, cítricos, coco, café, maíz, trébol, algodón, una cucurbitácea, pepino, abeto Douglas, berenjena, eucalipto, lino, ajo, uvas, lúpulo, puerro, lechuga, pino Loblolly, mijo, melones, frutos secos, avena, aceitunas, cebolla, ornamental, palma, pasto, guisantes, maní, pimienta, gandul, pino, papa, álamo, calabaza, pino Radiata, rábano, colza, arroz, portainjertos, centeno, cártamo, arbusto, sorgo, pino del Sur, soja, espinaca, calabaza, frutilla, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol,

maíz, (es decir, maize, como el maíz dulce o el maíz de campo), goma dulce, batata, hierbas *switchgrass*, té, tabaco, tomate, triticale, césped, sandía y trigo. En determinadas formas de realización, se proporcionan plantas transgénicas y partes de las plantas transgénicos regeneradas a partir de una célula vegetal transgénica. En determinadas formas de realización las plantas transgénicas se pueden obtener a partir de una semilla transgénica cortando, rompiendo, triturando o desvinculando de otro modo la parte de la planta. En determinadas formas de realización, la parte de la planta puede ser una semilla, una cápsula, una hoja, una flor, un tallo, una raíz, o cualquier porción de los mismos, o una porción no regenerable de una parte de la planta transgénica. Como se utiliza en este contexto, una porción “no regenerable” de una parte de planta transgénica es una porción que no se puede inducir para formar una planta completa o que no se puede inducir para formar una planta completa que sea capaz de reproducirse de forma sexual y/o asexual. En algunas formas de realización, una porción no regenerable de una parte de planta es una porción de una semilla, una cápsula, una hoja, una flor, un tallo, una raíz transgénica.

[074] Se proporcionan métodos para realizar plantas transgénicas que comprenden cantidades inhibitoras de insectos, Lepidópteros o Hemípteros de una proteína TIC2199. Dichas plantas se pueden realizar mediante la introducción de un polinucleótido recombinante que codifica cualquiera de las proteínas proporcionadas en la presente solicitud en una célula vegetal y la selección de una planta derivada de dicha célula vegetal que exprese una cantidad de proteínas inhibitoria para los insectos, los Lepidópteros. Las plantas se pueden derivar de las células vegetales mediante técnicas de regeneración, o transformación de semilla, polen o meristemas. Los métodos de transformación de plantas son conocidos en la técnica.

[075] En el presente documento también se divulgan los productos de plantas procesados, en donde el producto procesado comprende una cantidad detectable de una TIC2199, un segmento inhibidor de insectos o fragmento del mismo, o cualquier porción distinguida de la misma. En determinadas formas de realización, el producto procesado se selecciona del grupo que consiste en partes de planta, biomasa vegetal, aceite, harina, azúcar, alimento para animales, harina, copos, salvado, pelusa, cáscaras, semillas procesadas y semillas. En ciertas formas de realización, el producto procesado no es regenerable. El producto de la planta puede comprender productos básicos u otros productos comerciales derivados de una planta transgénica o una parte de la planta transgénica, en donde el producto básico u otros productos se pueden rastrear en el comercio

mediante la detección de segmentos nucleotídicos o ARN expresado o proteínas que codifican o comprenden porciones distinguidas de una TIC2199.

[076] Las plantas que expresan la proteína TIC2199 pueden cruzarse con eventos transgénicos que expresan otras proteínas de toxina y/o que expresan otros rangos transgénicos tales como genes de tolerancia a herbicidas, genes que confieren rasgos de rendimiento o tolerancia al estrés y similares, o tales rasgos se pueden combinar en un único vector apilado de manera que se unan todos los rasgos.

[077] Como se describe más adelante en los Ejemplos, se pueden identificar las secuencias que codifican la proteína TIC2199 y las secuencias que tienen un porcentaje de identidad a TIC2199 sustancial utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por su sigla en inglés), amplificación térmica e hibridación. Por ejemplo, las proteínas TIC2199 se pueden utilizar para producir anticuerpos que se unen específicamente a proteínas relacionadas y se pueden utilizar para buscar y encontrar otros miembros de proteínas que están estrechamente relacionados.

[078] Además, las secuencias de nucleótidos que codifican la proteína de toxina TIC2199 se pueden utilizar como sondas y cebadores para el cribado con el fin de identificar otros miembros de la clase utilizando métodos de ciclo térmico o amplificación isotérmica e hibridación. Por ejemplo, los oligonucleótidos derivados de secuencias como se indica en las SEQ ID NO: 3, 6, 9 o 12 se pueden utilizar para determinar la presencia o la ausencia de un transgén de TIC2199 en una muestra de ácido desoxirribonucleico derivado de un producto básico. Dada la sensibilidad de determinados métodos de detección de ácido nucleico que emplean oligonucleótidos, se anticipa que los oligonucleótidos derivados de secuencias como se indica en la SEQ ID NO: 3 se pueden utilizar para detectar un transgén de TIC2199 en productos básicos derivados de fuentes agrupadas en las cuales solamente una fracción del producto básico se deriva de una planta transgénica que contiene cualquiera de los transgenes. También se reconoce que dichos oligonucleótidos se pueden utilizar para introducir una variación de la secuencia nucleotídica en cada una de las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 16 o 18. Dichos oligonucleótidos de “mutagénesis” son útiles para la identificación de variantes de la secuencia de aminoácidos de TIC2199 que muestran un rango de actividad inhibidora de insectos o una expresión variada en células huésped de la planta transgénica.

[079] Los homólogos de secuencias de nucleótidos, por ejemplo, las proteínas insecticidas codificadas por secuencias de nucleótidos que hibridan con cada una de las secuencias divulgadas en la presente solicitud o con cualquiera de ellas en condiciones de hibridación estrictas, son también una forma de realización de la presente invención. La invención además proporciona un método para detectar una primera secuencia de nucleótidos (o su secuencia de complemento inversa) codifica una proteína plaguicida o fragmento plaguicida del mismo y se hibrida a la segunda secuencia de nucleótido. En tal caso, la segunda secuencia de nucleótidos puede ser cualquiera de las secuencias de nucleótidos presentada como de las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 16 o 18 en condiciones de hibridación estrictas. Las secuencias codificadoras de nucleótidos se hibridan entre sí en condiciones de hibridación apropiadas, tales como condiciones de hibridación estrictas, y las proteínas codificadas por estas secuencias de nucleótidos reaccionan de forma cruzada con el antisuero levantado contra una cualquiera de las otras proteínas. Las condiciones de hibridación estrictas, como se definen en el presente documento, comprenden, al menos, una hibridación a 42°C seguida de dos lavados durante cinco minutos cada uno a temperatura ambiente con 2X SSC, 01% SDS, seguido de dos lavados durante treinta minutos cada uno a 65°C en 0,5X SSC, 0,1% SD. Los lavados a una temperatura incluso más alta constituyen condiciones aún más estrictas, por ejemplo, condiciones de hibridación a 68°C, seguida de lavado a 68°C, en 2xSSC que contienen 0,1% SDS.

[080] Un experto en la técnica reconocería que, debido a la redundancia de código genético, muchas otras secuencias son capaces de codificar dichas proteínas relacionadas y esas secuencias, en la medida que funcionen para expresar proteínas plaguicidas en cepas *Bacillus* o en células vegetales, son formas de realización de la presente invención; reconociendo, obviamente, que muchas de las secuencias codificadoras redundantes no se hibridan en estas condiciones con las secuencias *Bacillus* nativas que codifican las variantes de TIC2199. La presente solicitud contempla el uso de estos y otros métodos conocidos por los expertos en la técnica para identificar las secuencias codificadoras de proteínas de la variante TIC2199 y las secuencias que tienen un porcentaje sustancial de identidad con las secuencias codificadoras de proteínas de la variante TIC2199.

[081] La divulgación además contempla el uso de métodos moleculares conocidos en la técnica para diseñar y clonar proteínas comercialmente útiles que comprenden quimeras de proteínas de proteínas plaguicidas; por ejemplo, las quimeras se pueden ensamblar a partir de segmentos de la

proteína TIC2199 para derivar formas de realización útiles adicionales que incluyen el ensamblaje de segmentos de la proteína TIC2199 con segmentos de diversas proteínas distintas a la proteína TIC2199 y proteínas relacionadas. La proteína TIC2199 se puede someter a una alineación entre sí y con otras *Bacillus*, *Paenibacillus* u otras proteínas plaguicidas (estén o no estrechamente relacionadas filogenéticamente) y se pueden identificar segmentos de cada una de esas proteínas que sean útiles para la sustitución entre las proteínas alineadas, lo que da lugar a la construcción de proteínas quiméricas. Dichas proteínas quiméricas se pueden someter a análisis de bioensayos de plagas y caracterizar por la presencia o la ausencia de una mayor bioactividad o un mayor espectro de plagas objetivo en comparación con las proteínas madre de las que se derivó cada segmento de la quimera. La actividad plaguicida de los polipéptidos se puede modificar aún más para que sean activos frente a una plaga concreta o frente a un espectro más amplio de plagas, intercambiando dominios o segmentos con otras proteínas o utilizando métodos de evolución dirigida conocidos en la técnica.

[082] En la presente solicitud se divulgan métodos para controlar insectos, en particular infestaciones de Lepidópteros en plantas de cultivos con la proteína TIC2199. Dichos métodos pueden comprender cultivar una planta que comprenda una cantidad inhibidora de insectos, o Lepidópteros, de una proteína de toxina TIC2199. En determinadas formas de realización, dichos métodos pueden además comprender uno cualquiera o más de: (i) aplicar cualquier composición que comprende o codifica una proteína de toxina TIC2199 a una planta o una semilla que dé lugar a una planta; y (ii) transformar una planta o una célula vegetal que dé lugar a una planta con un polinucleótido que codifica una proteína de toxina TIC2199. En general, se contempla que una proteína de toxina TIC2199 se puede proporcionar en una composición, en un microorganismo o en una planta transgénica para conferir actividad inhibidora de insectos contra los insectos lepidópteros.

[083] En determinadas formas de realización, una molécula de ácido nucleico recombinante de la proteína de toxina TIC2199 es el ingrediente insecticidamente activo de una composición inhibidora de insectos preparada mediante el cultivo de *Bacillus* recombinante o cualquier otra célula bacteriana recombinante para expresar una proteína de toxina TIC2199 en condiciones adecuadas para expresar la proteína de toxina TIC2199. Esta composición se puede preparar mediante desecación, liofilización, homogeneización, extracción, filtración, centrifugación, sedimentación o concentración de un cultivo de dichas células recombinantes que

expresan/producen dicho polipéptido recombinante. Dicho proceso puede dar como resultado un extracto celular de *Bacillus* u otra bacteria entomopatógena, una suspensión celular, un homogeneizado celular, un lisado celular, un sobrenadante celular, un filtrado celular o un gránulo celular. Al obtener los polipéptidos recombinantes así producidos, una composición que incluye los polipéptidos recombinantes puede incluir células bacterianas, esporas bacterianas y cuerpos de inclusión paraesporicos y se puede formular para varios usos, incluyendo como productos agrícolas de pulverización inhibidores de insectos o como formulaciones inhibidoras de insectos en bioensayos dietéticos.

[084] En una forma de realización, para reducir la probabilidad de desarrollo de resistencia, una composición inhibidora de insectos que comprenda la proteína TIC2199 puede además comprender al menos un polipéptido adicional que muestre actividad inhibidora de insectos contra la misma especie de insecto lepidóptero, pero que sea diferente de la proteína de la toxina TIC2199. Los posibles polipéptidos adicionales para tal composición incluyen una proteína inhibidora de insectos y una molécula de ARNdc inhibidora de insectos. Un ejemplo para el uso de dichas secuencias de ribonucleótidos para controlar plagas de insectos se describe en Baum, *et al.* (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2006/0021087 A1). Dicho polipéptido adicional para el control de plagas de Lepidópteros se puede seleccionar del grupo que consiste en una proteína inhibidora de insectos, tal como, pero sin limitarse a, Cry1A (Patente de los Estados Unidos Nro. 5.880.275), Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B (Publicación de Patente de los Estados Unidos Nro. 10/525.318), Cry1C (Patente de los Estados Unidos Nro. 6.033.874), Cry1D, Cry1Da y variantes de los mismos, Cry1E, Cry1F, y quimeras de Cry1A/F (Patentes de los Estados Unidos Nro. 7.070.982, 6.962.705 y 6.713.063), quimeras de los tipos Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, Cry1 tales como, entre otros, TIC836, TIC860, TIC867, TIC869 y TIC1100 (Publicación de Solicitud Internacional WO2016/061391 (A2)), TIC2160 (Publicación de Solicitud Internacional WO2016/061392(A2)), Cry2A, Cry2Ab (Patente de los Estados Unidos Nro. 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 de los Estados Unidos 2013-0117884 A1), AXMI-52, AXMI-58, AXMI-88, AXMI-97, AXMI-102, AXMI-112, AXMI-117, AXMI-100 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2013-0310543 A1), AXMI-115, AXMI-113, AXMI-005 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2013-0104259 A1),

AXMI-134 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2013-0167264 A1), AXMI-150 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2010-0160231 A1), AXMI-184 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2010-0004176 A1), AXMI-196, AXMI-204, AXMI-207, AXMI-209 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2011-0030096 A1), AXMI-218, AXMI-220 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014-0245491 A1), AXMI-221z, AXMI-222z, AXMI-223z, AXMI-224z, AXMI-225z (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014-0196175 A1), AXMI-238 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014-0033363 A1), AXMI-270 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014-0223598 A1), AXMI-345 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014-0373195 A1), AXMI-335 (Publicación de Solicitud Internacional WO2013/134523(A2)), DIG-3 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2013-0219570 A1), DIG-5 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2010-0317569 A1), DIG-11 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2010-0319093 A1), AfIP-1A y derivados del mismo (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014-0033361 A1), AfIP-1B y derivados del mismo (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014-0033361 A1), PIP-1APIP-1B (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014-0007292 A1), PSEEN3174 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014-0007292 A1), AECFG-592740 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014-0007292 A1), Pput_1063 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014-0007292 A1), DIG-657 (Publicación de Solicitud Internacional WO2015/195594 A2), Pput_1064 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014-0007292 A1), GS-135 y derivados del mismo (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2012-0233726 A1), GS153 y derivados del mismo (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2012-0192310 A1), GS154 y derivados del mismo (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2012-0192310 A1), GS155 y derivados del mismo (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2012-0192310 A1), SEQ ID NO: 2 o 4 y derivados de las mismas como se describen en la Publicación de Patente de los Estados Unidos 2012-0167259 A1, SEQ ID NO: 2 o 4 y derivados de las mismas como se describen en la Publicación de Patente de los Estados Unidos 2012-0047606 A1, SEQ ID NO: 2 o 4 y derivados de las mismas como se describen en la Publicación de Patente de los Estados Unidos 2011-0154536 A1, SEQ ID NO: 2 o 4 y derivados de las mismas como se describen en la Publicación de Patente de los Estados Unidos 2011-0112013 A1, SEQ ID NO: 2 o 4 y derivados de las mismas como se describen en la Publicación de Patente de los Estados Unidos 2010-0192256 A1, SEQ ID NO: 2 o 4 y derivados de las mismas como se describen en la Publicación

de Patente de los Estados Unidos 2010–0077507 A1, SEQ ID NO: 2 o 4 y derivados de las mismas como se describen en la Publicación de Patente de los Estados Unidos 2010–0077508 A1, SEQ ID NO: 2 o 4 y derivados de las mismas como se describen en la Publicación de Patente de los Estados Unidos 2009–0313721 A1, SEQ ID NO: 2 o 4 y derivados de las mismas como se describen en la Publicación de Patente de los Estados Unidos 2010–0269221 A1, SEQ ID NO: 2 o 4 y derivados de las mismas como se describen en la Patente de los Estados Unidos Nro. 7.772.465 (B2), CF161_0085 y derivados del mismo como se describen en el documento WO2014/008054 A2, proteínas tóxicas para los Lepidópteros y sus derivados como se describe en las Publicaciones de Patentes de los Estados Unidos US2008–0172762 A1, US2011–0055968 A1 y US2012–0117690 A1; SEQ ID NO: 2 o 4 y derivados de las mismas como se describen en US7510878(B2), SEQ ID NO: 2 o 4 y derivados de las mismas como se describen en la Patente de los Estados Unidos Nro. 7812129(B1) y similares.

[085] En otras formas de realización, dicha composición/formulación puede además comprender al menos un polipéptido adicional que exhibe actividad inhibidora de insectos a un insecto no inhibido por otra proteína inhibidora de insectos de la presente invención para ampliar el espectro de inhibición de insectos obtenido. Por ejemplo, para el control de plagas de Hemípteros, se pueden utilizar combinaciones de proteínas inhibidoras de insectos de la presente invención con proteínas activas de Hemípteros tales como TIC1415 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2013–0097735 A1), TIC807 (Patente de los Estados Unidos Nro. 8609936), TIC834 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2013–0269060 A1), AXMI–036 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2010–0137216 A1) y AXMI–171 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2013–0055469 A1). Además, se puede seleccionar un polipéptido para el control de plagas de Coleópteros del grupo que consiste en una proteína inhibidora de insectos, tales como, entre otros, Cry3Bb (Patente de los Estados Unidos Nro. 6.501.009), variantes de Cry1C, variantes de Cry3A, Cry3, Cry3B, Cry34/35, 5307, AXMI134 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2013–0167264 A1) AXMI–184 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2010–0004176 A1), AXMI–205 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014–0298538 A1), AXMI–207 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2013–0303440 A1), AXMI–218, AXMI–220 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 20140245491^a1), AXMI–221z, AXMI–223z (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014–0196175 A1), AXMI–279 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014–0223599 A1), AXMI–R1 y variantes del mismo (Publicación

de Patente de los Estados Unidos 2010-0197592 A1, TIC407, TIC417, TIC431, TIC807, TIC853, TIC901, TIC1201, TIC3131, DIG-10 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2010-0319092 A1), eHIPs (Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nro. 2010/0017914), IP3 y variantes del mismo (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2012-0210462 A1), y α -Hexatoxin-Hv1a (Publicación de Patente de los Estados Unidos US2014-0366227 A1).

[086] En el sitio web mantenido por Neil Crickmore (en www.btnomenclature.info) se pueden encontrar polipéptidos adicionales para el control de plagas de insectos Coleópteros, Lepidópteros y Hemípteros, que se pueden combinar con las proteínas inhibidoras de insectos de la clase TIC2199. En términos generales, se contempla que cualquier proteína inhibidora de insectos conocida por los expertos en la técnica se puede utilizar en combinación con las proteínas de la familia TIC2199 tanto en la planta (combinadas mediante cría o apilamiento molecular) como en una composición o formulación como bioplaguicida o combinación de bioplaguicidas.

[087] La posibilidad de que los insectos desarrollen resistencia a determinados insecticidas se ha documentado en la técnica. Una estrategia de gestión de la resistencia de los insectos consiste en emplear cultivos transgénicos que expresen dos agentes inhibidores de insectos distintos que actúen a través de diferentes modos de acción. Por lo tanto, cualquier insecto con resistencia a uno de los agentes inhibidores de insectos puede ser controlado por el otro agente inhibidor de insectos. Otra estrategia de gestión de la resistencia de los insectos emplea el uso de plantas que no están protegidas contra las especies de plagas de Lepidópteros objetivo para proporcionar un refugio a dichas plantas no protegidas. Un ejemplo particular se describe en la Patente de los Estados Unidos Nro. 6.551.962, que se incorpora en su totalidad como referencia.

[088] Otras formas de realización, como los productos químicos plaguicidas de aplicación tópica que están diseñados para controlar las plagas que también son controladas por las proteínas divulgadas en el presente documento, para ser utilizados con proteínas en tratamientos de semillas, en formulaciones de pulverización, goteo o limpieza, pueden aplicarse directamente al suelo (un empapado del suelo), aplicarse a plantas en crecimiento que expresan las proteínas divulgadas en el presente documento, o formularse para ser aplicadas a semillas que contienen uno o más transgenes que codifican una o más de las proteínas divulgadas. Dichas formulaciones para su uso en tratamientos de semillas se pueden aplicar con varios adhesivos y tachuelas conocidos en la técnica. Dichas formulaciones pueden contener plaguicidas que son sinérgicos en el modo de

acción con las proteínas divulgadas, de modo que los plaguicidas de la formulación actúan a través de un modo de acción diferente para controlar las mismas o similares plagas que pueden ser controladas por las proteínas divulgadas, o que dichos plaguicidas actúan para controlar las plagas dentro de un rango más amplio de huéspedes o especies de plagas de plantas que no son controladas eficazmente por la proteína plaguicida TIC2199.

[089] La composición/formulación antes mencionada puede además comprender un portador aceptable desde el punto de vista agrícola, como un cebo, un polvo, un comprimido, un gránulo, un aerosol, una emulsión, una suspensión coloidal, una solución acuosa, una preparación de esporas/cristales de *Bacillus*, un tratamiento de semillas, una célula vegetal recombinante/tejido vegetal/semilla/planta transformada para expresar una o más de las proteínas, o una bacteria transformada para expresar una o más de las proteínas. Dependiendo del nivel de inhibición de insectos o inhibición insecticida inherente al polipéptido recombinante y del nivel de formulación que se aplique a una planta o a un ensayo dietético, la composición/formulación puede incluir diversas cantidades en peso del polipéptido recombinante, por ejemplo, desde el 0,0001% hasta el 0,001% o el 0,01% hasta el 1% o el 99% en peso del polipéptido recombinante.

[090] En vista de lo anterior, los expertos en la técnica apreciarían que se pueden realizar cambios en los aspectos específicos que se divulgan y aun así obtener un resultado igual o similar sin apartarse del espíritu y el alcance de la invención. De esta manera los detalles estructurales y funcionales específicos divulgados en el presente documento no se deben interpretar como limitantes. Se debe comprender que la divulgación completa de cada referencia citada en el presente documento se incorpora dentro de la divulgación de la presente solicitud.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Descubrimiento, clonación y expresión de TIC2199

[091] La proteína plaguicida TIC2199 se identificó a través del análisis de secuencia del genoma de la cepa EG8639 de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). La cepa EG8639 de *Bt* se identificó en un principio como una cepa de *Bt* o bacteria similar a *Bt* formadora de esporas, con cristales y plásmidos. Se aisló el ADN de EG8639 y se secuenció. La secuencia ensamblada luego se analizó de forma bioinformática. La proteína TIC2199 se identificó mediante un análisis de pfam para obtener coincidencias de dominios de endotoxina e identidad con una toxina Cry1Ib3 conocida, acceso ACD75515 a GenBank. La secuencia de aminoácidos de la proteína TIC2199 en toda su longitud presenta una identidad del 95,13% con la secuencia de aminoácidos de la proteína CryIb3 de acceso ACD75515 a GenBank.

[092] Se diseñaron cebadores para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el fin de amplificar una copia de longitud completa de la región codificadora de TIC2199 a partir de ADN genómico total aislado de la cepa EG8639 de *Bt*. Los amplicones de la PCR se clonaron mediante métodos conocidos en la técnica en dos constructos de plásmidos: una en un vector de expresión de *Escherichia coli* (*Ec*) en enlace operable con un promotor expresable en *Ec* y una etiqueta de histidina utilizada para la purificación de la proteína; y la otra en un vector de expresión de *Bt* en enlace operable con un promotor expresable en *Bt*. En el bioensayo se utilizaron preparaciones de TIC2199 derivadas tanto de *Ec* como de *Bt*.

Ejemplo 2

El TIC2199 demostró actividad contra los Lepidópteros en un bioensayo con insectos

[093] La proteína plaguicida TIC2199 se expresó en *Ec* y *Bt* recombinante utilizando los vectores descritos en el Ejemplo 1 y las proteínas resultantes expresadas en los sistemas se ensayó la toxicidad de varias especies de Lepidópteros, Coleópteros y Hemípteros.

[094] Se ensayó la toxicidad del TIC2199 para las especies de insectos lepidópteros Gusano cortador negro (BCW, *Agrotis ipsilon*), Gusano elotero (CEW, *Helicoverpa zea*, también conocido como Gusano de la vaina de la soja), Gusano medidor falso (CLW, *Trichoplusia ni*), Taladro del maíz (ECB, *Ostrinia nubilalis*), Gusano Cogollero del maíz (FAW, *Spodoptera frugiperda*), Oruga militar del sur (SAW, *Spodoptera eridania*), Gusano falso medidor (SBL, *Chrysodeixis includens*),

Barrenador de la caña de azúcar (SCB, *Diatraea saccharalis*), Barrenador del tallo (SWC, *Diatraea grandiosella*) e Isoca de las leguminosas (VBC, *Anticarsia gemmatalis*); las especies de Coleópteros Gusano de la raíz del maíz occidental (WCR –por su sigla en inglés–, *Diabrotica virgifera*) y Gusano alfilerillo del maíz (SCR –por su sigla en inglés–, *Diabrotica undecimpunctata*); las especies de Hemípteros chinche de las plantas (TPB, *Lygus lineolaris*), Chinche opaca de las plantas (*Lygus hesperus*) y chinche marrón neotropical (NBSB –por su sigla en inglés–, *Euschistus heros*). Los resultados del bioensayo se presentan en la Tabla 2 a continuación en donde “+” indica actividad y “-” indica que no hay actividad.

Tabla 2. Actividad de TIC2199 contra especies de insectos Lepidópteros, Coleópteros y Hemípteros.

Lepidópteros										
BCW	CEW	CLW	ECB	FAW	SAW	SBL	SCB	SWC	VBC	WBC
+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Coleópteros										
WCR	SCR									
-	-									
Hemípteros										
TPB	WTP	NBSB								
+	-	+								

[095] Como se puede observar a partir de los datos presentados en la Tabla 2, TIC2199 demostró actividad contra las especies de Lepidópteros CW, CLW, ECB, FAW, SAW, SBL, SCB, SWC, VBC y WBC, y las especies de Hemípteros TPB y NBSB.

Ejemplo 3

Diseño de secuencias codificadoras artificiales para TIC2199 para utilizar en la expresión en plantas.

[096] Se diseñaron secuencias codificadoras artificiales SEQ ID NO: 3, 6, 9, 12, 14, 16 y 18 que codifican TIC2199 y truncamientos de TIC2199 para su expresión en una célula vegetal. La secuencia artificial (denominada alternativamente como sintética) se sintetizó, de acuerdo con los

métodos generalmente descritos en la Patente de los Estados Unidos 5.500.365, para evitar ciertas secuencias problemáticas inimputables, como las secuencias de poliadenilación de plantas ricas en ATTTA y A/T, preservando al mismo tiempo la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa de *Bacillus*.

5 [097] Las secuencias artificiales que codifican TIC2199, TIC2199_1, TIC2199_2 y TIC2199_3 se clonaron en vectores de transformación de plantas y se vincularon de manera funcional a promotores de plantas para impulsar la expresión de la secuencia codificadora cuando se encuentra en una célula vegetal, utilizando técnicas conocidas en la técnica. Cinco de los vectores de transformación resultantes utilizados para transformar plantas de maíz comprendían un primer
10 casete de transgén para la expresión de la proteína plaguicida TIC2199 que comprendía un promotor constitutivo, unido de forma operativa 5' a un líder, unido de forma operativa 5' a un intrón, unido de forma operativa 5' a una secuencia codificadora artificial que codificaba TIC2199, que a su vez estaba unida de forma operativa 5' a una UTR 3' y un segundo casete de transgén para la selección de las células vegetales transformadas mediante selección con glifosato. Nueve
15 vectores de transformación vegetal además contenían un péptido de tránsito del cloroplasto (CTP) que estaba clonado de forma operativa 5' y en marco con la secuencia codificadora de TIC2199 para dirigir la acumulación de proteína en el cloroplasto. Seis de los nueve vectores de transformación vegetal que comprenden un péptido de tránsito del cloroplasto comprendían las secuencias codificadoras SEQ ID NO: 3, 6, 9 o 12. Tres de los nueve vectores de transformación
20 vegetal que comprenden un péptido de tránsito del cloroplasto comprendían las secuencias codificadoras SEQ ID NO: 14, 16 o 18.

Ejemplo 4

TIC2199 exhibe actividad de Lepidópteros cuando se expresa en plantas de maíz

25 transformadas de forma estable

[098] Los vectores binarios de transformación de plantas que comprenden casetes de transgenes diseñados para expresar las proteínas plaguicidas TIC2199 y la variante de truncamiento TIC2199 se clonaron utilizando métodos conocidos en la técnica. Los vectores resultantes se utilizaron para transformar de forma estable plantas de maíz. Se cosecharon tejidos de las transformantes y se
30 utilizaron en bioensayos con insectos contra varias especies de insectos lepidópteros.

[0099] Las plantas de maíz se transformaron con los 6 vectores binarios de transformación como se describe en el Ejemplo 3 utilizando un método de transformación mediado por *Agrobacterium*. Las células transformadas se introdujeron para formar plantas mediante métodos conocidos en la técnica. Los bioensayos que utilizan discos de hojas de plantas se realizaron de forma análoga a los descritos en la Patente de los Estados Unidos Nro. 8.344.207. En cada muestra de disco de hoja se colocó una sola larva neonata recién eclosionada de menos de un día de edad y se le permitió alimentarse durante aproximadamente cuatro días. Se utilizó una planta de maíz no transformada para obtener tejido que se utilizaría como control negativo. Se evaluaron los eventos de transformación múltiple R₀ de copia única de cada vector binario contra el Gusano cortador negro (BCW, *Agrotis ipsilon*), Taladro del maíz (ECB, *Ostrinia nubilalis*), Gusano Cogollero del maíz (FAW, *Spodoptera frugiperda*) y Barrenador del tallo (SWC, *Diatraea grandiosella*). Se asignó una puntuación de eficacia que iba de 0 a 3, siendo 0 ninguna eficacia y 3 una gran eficacia, a cada evento basado en el porcentaje de daños en las hojas en el bioensayo.

[0100] En base a las puntuaciones de eficacia, TIC2199, TIC2199_1, TIC2199_2 y TIC2199_3 demostraron una puntuación de eficacia de 3 en los eventos de transformación múltiple R₀ de copia única contra ECB y SWC con o sin un CTP y fue altamente eficaz contra estas dos especies de plagas de insectos.

[0101] Las plantas de R₀ seleccionadas derivadas de 3 vectores de transformación que expresan el TIC2199 se cruzaron con plantas de variedades de élite de tipo salvaje no transformadas para producir semillas híbridas. Las semillas F₁ heterocigotas que contenían TIC2199 se cultivaron y ensayaron como se ha descrito anteriormente contra el Gusano cortador negro (BCW, *Agrotis ipsilon*), Taladro del maíz (ECB, *Ostrinia nubilalis*), Gusano Cogollero del maíz (FAW, *Spodoptera frugiperda*) y Barrenador del tallo (SWC, *Diatraea grandiosella*). Basándose en las puntuaciones de eficacia, las plantas de maíz F₁ transformadas de forma estable que expresan TIC2199 fueron altamente eficaces contra ECB y el SWC con o sin CTP.

[0102] Las plantas que expresan TIC2199 se evaluaron contra el Barrenador de la caña de azúcar (SCB, *Diatraea saccharalis*), y el Barrenador menor del tallo (LCSB, *Elasmopalpus lignosellus*) utilizando ensayos de disco de hoja similares a los descritos anteriormente. TIC2199 fue eficaz contra el SCB y altamente eficaz contra el LCSB.

Ejemplo 5

Ensayo de la actividad de TIC2199 contra plagas de insectos lepidópteros en plantas de soja transformadas de forma estable

[0103] Los vectores binarios de transformación de plantas que comprenden casetes de transgenes diseñados para expresar la proteína plaguicida TIC2199 se clonan utilizando métodos conocidos en la técnica. El vector resultante se utiliza para transformar plantas de soja transformadas de forma estable. Se cosechan tejidos de las transformantes y se utilizan en bioensayos con insectos contra varias especies de insectos lepidópteros.

[0104] La secuencia codificadora artificial que codifica TIC2199 y las variantes de truncamiento de la TIC2199 se clonan en constructos de vectores de transformación de plantas utilizando técnicas conocidas en la técnica. Los constructos de vectores de transformación resultantes comprenden un primer casete de transgén para la expresión de la proteína plaguicida TIC2199 que comprende un promotor expresable en la planta, enlazado de forma operativa 5' a un líder, opcionalmente enlazado de forma operativa 5' a un intrón, enlazado de forma operativa 5' a una secuencia codificadora artificial que codifica TIC2199, que a su vez está enlazada de forma operativa 5' a una UTR 3' y; un segundo casete transgénico para la selección de las células vegetales transformadas mediante selección con espectinomicina. Opcionalmente, un péptido de tránsito del cloroplasto (CTP) se puede clonar en 5' y en el marco de la secuencia codificadora artificial de TIC2199.

[0105] Las plantas de soja se transforman utilizando un método de transformación mediado por *Agrobacterium*. Las células transformadas se inducen para formar plantas mediante métodos conocidos en la técnica. Los bioensayos que utilizan discos de hojas de plantas se realizan de forma análoga a los descritos en la Patente de los Estados Unidos Nro. 8.344.207. En cada muestra de disco de hoja se coloca una única larva neonata recién eclosionada de menos de un día de edad y se le permite alimentarse durante aproximadamente cuatro días. Se utiliza una planta de maíz no transformada para obtener tejido que se utilizará como control negativo. Se evalúan los eventos de transformación múltiple R₀ de una sola copia de inserción de cada vector binario contra especies de insectos lepidópteros tales como, pero no limitados a, la Oruga militar negra (BAW –por su sigla en inglés–, *Spodoptera cosmioides*), la Oruga militar del sur (SAW –por su sigla en inglés–, *Spodoptera eridania*), el Gusano falso medidor (SBL –por su sigla en inglés–, *Chrysodeixis includens*), la Oruga medidora (SFL –por su sigla en inglés–, *Rachiplusia nu*) e Isoca de las leguminosas (VBC –por su sigla en inglés–, *Anticarsia gemmatalis*). Se asignó una puntuación de

eficacia que oscila entre 0 a 3 a cada evento en base al porcentaje de daño de la hoja en el bioensayo para cada evento y el porcentaje de eventos que compartieron el menor rango de daños (Penetración), como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Puntuaciones de calificación de la eficacia.

Puntuación de eficacia	Porcentaje de daño de las hojas	Penetración
0	>50%	≥80%
1	<50%	≥20%
2	<30%	≥20%
3	≤10%	≥50%

5

Ejemplo 6

Ensayo de la actividad de TIC2199 contra plagas de insectos Hemípteros en plantas de soja transformadas de forma estable

[0106] Los vectores binarios de transformación de plantas que comprenden casetes de transgenes diseñados para expresar la proteína pesticida TIC2199 se clonan utilizando métodos conocidos en la técnica. Los vectores resultantes se utilizan para transformar plantas de soja transformadas de forma estable. Se cosechan tejidos de las transformantes y se utilizan en bioensayos con insectos contra varias especies de insectos lepidópteros.

[0107] La secuencia codificadora artificial que codifica TIC2199 se clona en constructos de vectores de transformación de plantas utilizando técnicas conocidas en la técnica. Los constructos de vectores de transformación resultantes son similares a las descritas en el Ejemplo 5 anterior. Opcionalmente, se puede clonar un péptido de tránsito del cloroplasto (CTP) 5' y en el marco de la secuencia codificadora artificial de TIC2199.

[0108] Las plantas de soja se transforman utilizando un método de transformación mediado por *Agrobacterium*. Las células transformadas se inducen para formar plantas mediante métodos conocidos en la técnica. El ensayo de la actividad contra las plagas de Hemípteros se realiza utilizando una variedad de técnicas que dependerán de la especie de plaga de Hemípteros y del tejido objetivo preferido de esa plaga. Por ejemplo, las especies de plagas de Hemípteros de la chinche apestosa suelen alimentarse de las semillas y las vainas en desarrollo de la planta de soja. Para ensayar la actividad contra las chinches apestosas, se cosechan las vainas en fase R5 de las

plantas de soja transgénica que expresan TIC2199 y se colocan en una placa de Petri cubierta o en una placa grande de varios pocillos que contiene una capa de agar o de papel húmedo para proporcionar humedad al entorno de alimentación. Las ninfas de la chinche apestosa en su segundo estadio se colocan en la placa de Petri o en la placa grande de varios pocillos. Se coloca una tapa
5 que permite el intercambio de oxígeno y evite la desecación sobre el entorno de alimentación. Se deja que las ninfas de chinches apestosas se alimenten durante varios días. Se miden el retraso en el crecimiento y la mortalidad y se comparan con las ninfas de chinches apestosas que se alimentan de vainas de plantas de soja no transformadas.

[0109] Alternativamente, el ensayo de actividad también se puede realizar en plantas enteras transformadas de forma estable. Las plantas transformadas que expresan TIC2199 se cultivan en
10 una cámara de crecimiento o en el invernadero. En la etapa R5, las plantas se encierran en una jaula hecha de láminas de plástico transpirable para "polinización" (Vilutis and Company Inc, Frankfort, IL). Las fundas de las láminas se fijan al tallo principal justo por encima de la superficie del suelo mediante un lazo de Velcro®. Cada planta se infesta con un número específico de ninfas
15 de chinches apestosas de segundo estadio. Las ninfas se liberan en cada jaula individual a través de una pequeña hendidura en el lado de la jaula y luego se cierra la jaula de forma segura para garantizar que los insectos no se escapen. Se deja que las ninfas se alimenten de las vainas de soja durante varios días o una semana o más. Se realizan observaciones cada día para determinar las medidas de atrofia y mortalidad. Al final del periodo de alimentación, se recogen las ninfas vivas
20 y muertas. Las plantas se cortan por debajo de las jaulas y se trasladan al laboratorio, donde se recogen los insectos de cada planta. Antes de abrir la jaula, las plantas se agitan energicamente para asegurarse de que todos los insectos se desprenden de sus lugares de alimentación hasta la base de la jaula. A continuación, se abre la base de la jaula y se retira todo el material vegetal y se coloca en una sábana negra. Los insectos se pueden recoger utilizando un aspirador o algún otro
25 medio. Se registra el número de insectos y su estado de desarrollo para cada planta. También se registra el número y el estado de desarrollo de las ninfas muertas. Estas mediciones se comparan con las obtenidas en el control negativo, las plantas no transformadas.

[0110] Los retrasos en el desarrollo de las ninfas de la chinche apestosa (atrofia) o la mortalidad se interpretan como una indicación de toxicidad si, en comparación con los controles no
30 transformados, hay una diferencia significativa.

Ejemplo 7

Ensayo de la actividad de TIC2199 contra plagas de insectos Hemípteros en planta de algodón transformadas de forma estable

[0111] El presente ejemplo describe el ensayo de la actividad contra plagas de insectos Hemípteros en plantas de algodón transformadas de forma estable para expresar TIC2199.

[0112] Los vectores binarios de transformación de plantas que comprenden casetes de transgenes diseñados para expresar tanto el TIC2199 dirigido y no dirigido a los plástidos se clonan utilizando métodos conocidos en la técnica.

[0113] Las plantas de algodón se transforman utilizando los vectores binarios de transformación de plantas. Las células transformadas de la planta de algodón se inducen para formar plantas enteras. El ensayo de la actividad contra las plagas de hemípteros se realiza utilizando una variedad de técnicas que dependerán de las especies de plagas de Hemípteros y del tejido objetivo preferido de esa plaga. Por ejemplo, las especies de plagas de Hemípteros de las chinches apestosas suelen alimentarse de semillas y, por lo tanto, el daño a las cápsulas de algodón es la principal preocupación. Principalmente dañan el algodón perforando las cápsulas y alimentándose de las semillas. Su actividad alimenticia puede dar lugar a manchas oscuras de aproximadamente 1/16 de pulgada de diámetro en el exterior de las cápsulas más grandes donde se alimentan. La alimentación de las semillas puede dar lugar a una reducción de la producción de pelusa y a una pelusa manchada cerca del lugar de alimentación. Debido a su tamaño, los adultos y las ninfas de cuarto y quinto estadio tienen el mayor potencial para dañar las cápsulas, por lo que es importante matar al insecto en sus primeros estadios ninfales. Las especies de plagas de Hemípteros *Lygus* se alimentan principalmente de los cuadrados y de las cápsulas jóvenes. Las ninfas son alimentadores más voraces y tienden a causar los daños más graves. Cuando se alimentan de los cuadrados, los *Lygus* se dirigen a las anteras en desarrollo, lo que a menudo provoca que el cuadrado se arrugue y se caiga de la planta. En el caso de los cuadrados que se convierten en cápsulas, éstas pueden tener anteras incapaces de formar polen, semillas no fecundadas y lóculos vacíos. Cuando se alimentan de las cápsulas, los *Lygus* se dirigen a las semillas en desarrollo, provocando pequeñas manchas negras hundidas en el exterior de la cápsula.

[0114] Un método para ensayar la actividad de TIC2199 en plantas de algodón transformadas de forma estable es utilizar cuadrados en un bioensayo con insectos. Los cuadrados se recogen de plantas de algodón transformadas que expresan TIC2199. Los cuadrados se pueden colocar en una

placa de Petri o cada cuadrado en un pozo de una placa de pozos grande. Las ninfas jóvenes neonatas de *Lygus* o chinche apestosa se colocan en la placa de Petri o en la placa de pocillos grande y se les permite alimentarse durante un tiempo determinado. Se miden el retraso en el crecimiento y la mortalidad a lo largo del tiempo de alimentación y se comparan con los controles en los que se utilizan cuadrados derivados de plantas de algodón no transformadas en el ensayo.

[0115] Alternativamente, el ensayo de actividad se puede realizar en plantas de algodón transformadas enteras. Por ejemplo, para ensayar contra especies de *Lygus*, se siembran semillas R₁ derivadas de plantas que expresan un TIC2199 en macetas de 10 pulgadas. Una planta de algodón no transformada, preferiblemente de la misma variedad que las plantas transformadas, se utiliza como control negativo. Las plantas se mantienen en una cámara ambiental con un fotoperiodo de dieciséis (16) horas de luz a treinta y dos (32) grados centígrados y ocho (8) horas de oscuridad a veintitrés (23) grados centígrados, y una intensidad de luz entre ochocientos (800) y novecientos (900) microeinsteins. Entre cuarenta (40) y cuarenta y cinco (45) días después de la plantación, las plantas individuales se encierran en una jaula hecha con láminas de plástico transpirable para la "polinización" (Vilutis and Company Inc, Frankfort, IL). Las fundas de las láminas se fijan al tallo principal justo por encima de la superficie del suelo mediante un lazo de Velcro®. En un tubo de plástico de fondo redondo de catorce mililitros (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) se recogen dos parejas de adultos sexualmente maduros de *Lygus lineolaris* o *Lygus hesperus* (de seis días de edad) de un cultivo de laboratorio y se utilizan para cada planta. Los adultos se liberan en cada jaula individual a través de una pequeña hendidura en el lado de la jaula y luego se cierra la jaula de forma segura para garantizar que los insectos no se escapen. Se deja que los insectos se apareen y las plantas se mantienen en la jaula durante veintiún (21) días.

[0116] Después de veintiún (21) días, las plantas se cortan por debajo de las jaulas y se trasladan a un laboratorio donde se recogen los insectos de cada planta y se cuentan. Antes de abrir la jaula, las plantas se agitan vigorosamente para asegurarse de que todos los insectos se desprenden de sus lugares de alimentación hasta la base de la jaula. A continuación, se abre la base de la jaula y se retira todo el material vegetal y se coloca en una sábana negra. Los insectos se recogen con un aspirador. A continuación, se inspecciona a fondo la planta para recuperar los insectos restantes. Se registra el número de insectos recogidos y su estado de desarrollo para cada planta. Los

recuentos de insectos se dividen en varios grupos en función de la madurez del Lygus: ninfas hasta el tercer estadio, cuarto estadio, quinto estadio y adultos.

[0117] Para ensayar contra especies de chinches apestosas, las semillas R₁ derivadas de plantas que expresan TIC2199 se siembran en macetas y se cultivan y enjaulan como se ha descrito anteriormente. También se utilizan plantas de algodón no transformadas como control negativo. Las ninfas de segundo estadio de la chinche apestosa se utilizan para infestar las plantas y se les permite alimentarse de los cuadros y las cápsulas durante varios días o semanas. Las plantas enjauladas se recogen como se ha descrito anteriormente y las chinches apestosas recogidas se examinan y se puntúa su mortalidad, así como se registra la madurez de las ninfas. Estas puntuaciones luego se comparan con las de las plantas de control negativo.

[0118] Todas las composiciones divulgadas y reivindicadas en el presente documento se pueden hacer y ejecutar sin experimentación indebida a la luz de la presente divulgación. Aunque las composiciones de esta invención se han descrito en términos de las formas de realización ilustrativas anteriores, será evidente para a los expertos en la técnica que se pueden aplicar variaciones, cambios, modificaciones y alteraciones a la composición descrita en el presente documento, sin apartarse del verdadero concepto, espíritu y alcance de la invención. Más específicamente, será aparente que determinados agentes que están química y fisiológicamente relacionados pueden ser sustituidos por los agentes descritos en este documento, mientras que se lograrían los mismos o similares resultados. Todos los sustitutos y modificaciones similares que resulten evidentes para los expertos en la técnica se consideran dentro del espíritu, el alcance y el concepto de la invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

[0119] Todas las publicaciones y documentos de patentes publicados que se citan en la especificación se incorporan en el presente documento como referencia en la misma medida que si se indicara específica e individualmente que cada publicación o solicitud de patente se incorpora como referencia.