



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 298 140**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01) **C07K 14/32** (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01) **A01N 63/00** (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01) **C12N 15/63** (2006.01)
C12N 15/866 (2006.01) **C12N 5/14** (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01) **C12Q 1/00** (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00927459 .8**

86 Fecha de presentación : **27.04.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1173591**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **23.01.2002**

54 Título: **Fusiones pesticidas.**

30 Prioridad: **28.04.1999 GB 9909796**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2008

73 Titular/es: **Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung
der angewandten Forschung e.V.
Hansastraße 27c
80686 München, DE**

72 Inventor/es: **Christou, Paul y
Mehlo, Luke**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 298 140 T3

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

DESCRIPCIÓN

Fusiones pesticidas.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a nuevos polipéptidos de fusión pesticidas que tienen partes de unión y tóxicas. También se refiere a procedimientos y materiales para la generación y utilización de dichos polipéptidos, y también a ensayos y kits para el ensayo de la toxicidad de los polipéptidos.

10 **Técnica anterior**

Las toxinas derivadas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) son bien conocidas en la técnica por tener propiedades insecticidas. En la naturaleza, las moléculas de protoxina grandes (130-160 kDa) se solubilizan en el medio alcalino del intestino medio del insecto. A continuación, las toxinas solubilizadas se dividen proteolíticamente en fragmentos más pequeños (30-80 kDa). Tras la solubilización y activación de cristales de endotoxina delta, la toxina interacciona con los receptores superficiales específicos de las células del intestino medio y forma poros en la membrana. El balance iónico de las células se rompe y las células se lisan.

De particular interés para los usuarios de toxinas Bt son su rango de huéspedes, toxicidad a bajas concentraciones, y la capacidad de insectos diana de desarrollar resistencia.

Se han descrito una serie de experimentos que investigan estos diversos puntos, con una visión de mejorar uno o más de ellos con respecto a la toxina nativa.

De este modo, esta generalmente aceptado que la presencia de receptores específicos en la membrana apical juega un papel importante en la especificidad de toxinas Bt (1). En dichas circunstancias, la potencia de la toxina puede depender de la abundancia del receptor y su afinidad por la proteína y también de la capacidad de la toxina para formar poros. Las proteínas cristalinas insecticidas CryIA(a) y CryIA(c) tienen un 82% de homología aunque la última de ellas tiene una actividad insecticida 10 veces superior hacia *Heliothis virescens* y *Trichoplusia ni* que CryIA(a) (4). El rastreo de homólogos y recombinaciones recíprocas entre estos dos genes indicó que los aminoácidos 335-450 en CryIA(c) se asocian con la actividad contra *T. ni*, mientras que los aminoácidos 335-615 en la misma toxina son necesarios para intercambiar la especificidad completa de *H. virescens* (4).

En general, la especificidad de una proteína insecticida es el resultado de diversas funciones, incluyendo el procesamiento proteolítico por las proteasas del intestino medio del insecto, funciones de unión al receptor y/o citolíticas (4). Los resultados de las deleciones terminales de una proteína cristalina insecticida específica de lepidópteros indicaron que las deleciones hasta el décimo codón desde el extremo 5' o el 645º codón desde el extremo 3' no eliminó la toxicidad (5).

Mediante mutagénesis dirigida de sitio, se ha determinado con ciertas dudas que las toxinas Cry tienen tres dominios funcionales. El dominio I está implicado en la inserción de toxinas en la membrana y afecta en el canal iónico, el dominio II está implicado en la unión al receptor y la inserción en la membrana, y el dominio III está implicado en la función del canal iónico, la unión al receptor y la inserción en la membrana (6).

Se han realizado estudios de unión con dos endotoxinas Bt delta (Bt2, una proteína cristalina recombinante de 130 kDa de *B. thuringiensis* subespecie *berliner*) y Bt4412 (una proteína cristalina de 136 kDa de *B. thuringiensis* subespecie *thuringiensis*) en vesículas de membrana con chapa estriada del gusano del cuerno del tabaco (*Manduca sexta*) y la mariposa de la col (*Pieris brassicae*) (12). La proteína activa Bt2 (60 kDa) se une y mata insectos de ambas especies, mientras que la proteína activa Bt4412 es altamente tóxica sólo para *M. sexta* larvas (12). En este estudio se reveló que *P. brassicae* tiene dos sitios de unión distintos para las toxinas Bt2 y Bt4412, ya que las dos proteínas competían de manera negligible por los sitios de unión de ambas (12).

Se clonó un receptor para la toxina CryIA(b) a partir de las células epiteliales del intestino medio de gusano del cuerno del tabaco susceptible, *M. sexta* (13). El receptor, una glicoproteína de membrana de 210 kDa se determinó que tenía una similitud del 30-60% y una identidad del 20-40% con la superfamilia de proteínas de caderina (13). Las caderinas son glicoproteínas de membrana y se cree que median en la agregación y clasificación celular dependiente de calcio (13). La función exacta del receptor no se elucidó. Se sugirió sin embargo que puede estar implicado en el transporte de membrana, una función similar a la de la proteína de transporte de péptidos intestinales humanos tipo caderina, que canaliza péptidos antibióticos a través de células epiteliales que recubren el intestino delgado (13). Las toxinas de *B. thuringiensis* se cree que actúan principalmente en células epiteliales en el intestino medio de insectos sensibles (13).

Se purificó otra proteína de unión a partir de *M. sexta* y se observó que tenía un tamaño de 120 kDa (14). La misma proteína, aminopeptidasa N, se purificó a partir de vesículas de membrana con chapa estriada *Lymantra dyspar* (la palomilla gitana) (14). Cuando se probaron de nuevo, CryIA(a), CryIA(b), CryIIA, CryIC, CryIIIA, CryIIB, CryID, CryIF y CryIVD, la aminopeptidasa N purificada de *L. dyspar* mostró una actividad de unión negligible (14). En cambio, se observó que la aminopeptidasa N purificada de *M. sexta* se unía a CryIA(a), CryIA(b) y CryIA(c) con fuerte

afinidad (14). Esta disparidad en la actividad de unión de aminopeptidasa N no está resultando. En cambio, se especuló que, o bien la proteína difiere según el insecto del cual se purificó o bien que las diferencias reflejan variaciones en las sensibilidades de los protocolos empleados (14). Una plaga de las cosechas, la palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*) ha desarrollado resistencia a Bt en poblaciones a campo abierto, aunque los experimentos de selección de laboratorio mostraron que muchos insectos pueden desarrollar resistencia a genes de Bt (17). Se observó que un gen autónomo recesivo en *P. xylostella* confiere una resistencia extremadamente elevada a 4 toxinas de Bt CryIA(a), CryIA(b), CryIA(c) y CryIF(16). Esto sugiere que dicha mutación que confiere resistencia a las cuatro toxinas de Bt da lugar a rotura del enlace a una proteína de unión única que actúa como receptor para las cuatro toxinas de Bt (16, 18). Esto sugiere que la resistencia a incluso múltiples plantas que contienen Bt es una posibilidad real.

WO 91/17254 (los regentes de la Universidad de California) describen un procedimiento para mejorar el rango de huéspedes o la toxicidad de toxinas insecticidas. Esencialmente, la proteína insecticida se combinó con la glicoproteína específica de unión al epitelio del intestino gp64 derivada del virus de la polihedrosis nuclear múltiple (MNPV) de *Autographa californica*. Se indicó que esta glicoproteína interaccionaba con los receptores superficiales de células epiteliales, permitiendo la concentración y entrada en células del intestino medio. En una realización alternativa, se sugirió que la proteína Cyt A podría utilizarse para aumentar la toxicidad. Se indicó que esta proteína se unía a ácidos grasos en la parte lipídica de las células, rompiéndolas mediante un modo de acción del tipo detergente. Las implicaciones para la resistencia, si es que hay alguna, no se describen.

Los dominios de unión en genes de Bt naturales también se han cambiado con otros genes de Bt para alterar la toxicidad de las proteínas (véase, por ejemplo, De Maagd *et al.* (1996) Appl Env Microb 62 No. 5:1537-1543). Tal y como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, en referencia a (16), esta estrategia puede no proporcionar propiedades mejoradas en cuanto a la posible resistencia.

A la luz de estas observaciones, se puede observar que los nuevos materiales pesticidas de toxinas, particularmente aquellos que ofrecen una estrategia alternativa o alguna ventaja sobre los descritos anteriormente, contribuirían a la técnica.

WO 98/18820 (Universidad de Carolina del Sur) describe composiciones que contienen toxina A de ricino (RTA) para tratar el cáncer o enfermedades autoinmunes. La RTA se puede asociar de forma heterodimérica con una toxina B de ricino mutada (RTB). También se describen dominios RTB fusionados a un ligando específico a un receptor superficial particular de la célula.

WO 96/10083 (CIBA-GEIGY) describe proteínas pesticidas específicas de insecto de *Bacillus*, y plantas transgénicas que las expresan. También se describen proteínas de fusión que comprenden la proteína específica de insecto fusionada a una proteína auxiliar.

US 5.668.255 (Murphy) describe fusiones de (i) una parte de unión a célula, por ejemplo, toxina de la difteria (DT) o IL-2, (ii) un dominio de translocación de membrana, por ejemplo, de DT, y (iii) una sustancia química a introducir en una célula. Las fusiones proporcionan un sistema de liberación de una toxina/agente de seguimiento/otra sustancia química en células diana para aplicaciones en la salud humana, basadas en principio en el mecanismo de unión-translocación por el que la DT entra en las células.

US 5.763.245 (Greenplate *et al.*) describe una combinación de *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) o CryIA(c) con 3-hidroxiesteroide oxidasa para controlar insectos tales como lepidópteros y gorgojos del algodón.

Descripción de la invención

Los presentes inventores han sintetizado genes de proteínas de fusión que expresan proteínas de fusión altamente tóxicas. Estas proteínas comprenden un dominio de toxina fusionado a un dominio de unión heterólogo que potencia la eficacia de la parte de toxina. El dominio de unión es preferiblemente uno que puede unirse de forma no específica a membranas celulares sin romperlas, permitiendo de este modo la concentración y la inmovilización del dominio de toxina en su sitio de acción sin la necesidad de que estén presentes receptores concretos. Esto se ha ejemplificado utilizando un parte derivada de Bt y una parte de unión a carbohidrato, tal como el dominio de unión a galactosa del gen de cadena de la toxina B de ricina.

La toxicidad del producto de expresión se ha demostrado que es superior para ser cualquiera de las partes constituyentes de la proteína de fusión, utilizando un ensayo nuevo modificado que emplea una línea celular de insectos y una pareja de colorantes fluorescentes. Se desarrolló el bioensayo *in vitro* para la valoración de la toxicidad de los productos génicos de fusión y se basa en el homodímero de etidio 1 y Calceína AM. Los dos fluoróforos se han utilizado previamente principalmente en ensayos de toxicidad de células vivas/muertas (39). Estos aspectos de la invención se describirán a continuación en el presente documento.

De este modo, en un primer aspecto de la presente invención se describe una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión pesticida que comprende

- (i) un dominio de toxina

(ii) un dominio de unión heterólogo capaz de unirse de forma no específica a una membrana celular sin romper la membrana.

Por “pesticida” se entiende que tiene toxicidad contra alguna o más tipos de plagas, particularmente plagas de invertebrados económicamente significativas incluyendo insectos y otros artrópodos, por ejemplo, arácnidos. Entre insectos se incluyen todas las etapas de desarrollo del insecto. Entre las clases concretas de insectos de interés se incluyen Lepidoptera, Coleoptera, Culicidae, Simuliidae, Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera y Diptera.

Por “polipéptido de fusión” se entiende un polipéptido que comprende dos o más componentes que son heterólogos entre sí, es decir, no son parte de una única cadena de polipéptido natural. Opcionalmente, se puede incluir una región enlazadora que puede facilitar el plegamiento de los dominios en su conformación natural mediante la reducción del impedimento estérico entre los dominios.

Por “toxina” se entiende un material que es tóxico para plagas, preferiblemente en una cantidad capaz de ser ingerida por una plaga. La parte de toxina de la proteína de fusión puede ser sintética o de origen natural, por ejemplo, procariotas, eucariotas (incluyendo hongos, plantas y animales). Se prevé particularmente la utilización de toxinas de proteínas ya estudiadas (tales como toxinas de Bt o aloquímicos defensores de las plantas, por ejemplo, inhibidores de proteasa tales como los de chícharo de vaca o soja) o partes de las mismas. Preferiblemente, éstas serán pesticidas, pero no tóxicas para humanos y animales. La toxina será preferiblemente aquella que tiene su verdadero sitio de acción en la membrana celular.

Las toxinas de Bt descritas anteriormente son particularmente eficaces como fuentes del componente toxina. En las formas más preferidas del primer aspecto de la invención, la toxina deriva de un polipéptido cry de Bt. De este modo, en una realización de este aspecto la toxina es cryIA(b) o (c) de Bt.

El dominio “de unión” del polipéptido de fusión se puede unir de forma no específica a una membrana celular sin romperla y, de este modo, no tóxica *per se*.

“De manera no específica” en este contexto significa que no requiere un receptor específico particular. Esto tiene la ventaja de que reduce la probabilidad de que la plaga sea capaz de desarrollar resistencia a la fusión a través de una mutación en la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un receptor de la toxina, como se cree que es el caso con cierta resistencia de Bt (véase las referencias 16, 17, 18). Proporciona una estrategia alternativa a procedimientos físicos que se puede utilizar para minimizar la probabilidad de resistencia desarrollando, es decir, mezclando plantas transformadas con Bt con plantas no transformadas durante la siembra para minimizar la presión selectiva.

El dominio “de unión” es no tóxico *per se*, es decir, aunque puede aumentar la toxicidad del dominio de toxina, no provoca en sí mismo una rotura significativa, o más preferiblemente ninguna rotura, en la membrana celular cuando se utiliza solo en la proteína fusión. De este modo, la parte de unión actúa de manera eficaz para permitir que la toxina ejerza su efecto, pero preferiblemente no altera el modo de acción del mecanismo de la toxina, proporcionando de este modo una especificidad y respuesta más predecible. Esto es particularmente útil en realizaciones en las que la proteína de fusión puede entrar en la cadena alimenticia de los animales y en las que la toxina se ha seleccionado cuidadosamente para que sean no tóxicas para los animales.

Preferiblemente, el dominio de unión se une a carbohidratos que están presentes en la parte extracelular de todas las membranas de células eucariotas en forma de glicolípidos y glicoproteínas. El dominio de unión servirá por tanto para anclar la toxina en un sitio de acción en una amplia variedad de células.

Preferiblemente, las células forman parte del epitelio del intestino de las plagas.

En realidad, se prefiere que la toxina se inmovilice en el sitio de acción, pero incluso si la inmovilización efectiva (irreversible) no tiene lugar, el uso del dominio de unión heterólogo aún actuará para aumentar la concentración eficaz de la toxina en su sitio de acción en la membrana celular.

En una realización de este aspecto, el dominio de unión consiste en toda o parte de una lectina. Las lectinas son bien conocidas en la técnica por su capacidad para unirse estrechamente a carbohidratos, lectinas diferentes tienen generalmente afinidades particulares para residuos de azúcar diferentes. Particularmente deseables son los dominios con afinidad a galactosa o galactosilo, lo cual permitiría una unión muy extendida en la clase de la plaga diana.

Preferiblemente, la lectina es una proteína inactivadora de ribosomas del tipo dos y se utiliza la cadena B (no tóxica). Los Ejemplos de este tipo incluyen:

(a) *Abrus precatorius* (Abrin)

(b) *Viscum album* (Viscumin)

(c) *Adenia digitata* (Modeccin)

(d) *Adenia volkensii* (Volkensin)

Se proporciona una tabla que muestra el origen y las propiedades de los cuatro ejemplos anteriores (Stirpe *et al.* 1992. Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Bio/Technology*, vol. 10, 405-412; Barbieri *et al.*, 1993. Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochemica et Biophysica Acta*, vol. 1154, 237-282).

Lo más preferible es utilizar en el ácido nucleico el gen de la cadena B de la toxina de ricina, derivado de la toxina de ricino. La ricina es una glicoproteína tóxica que comprende dos cadenas de polipéptidos, A y B, unidas por un enlace disulfuro (32).

La unión de la cadena B a los residuos terminados en galactosilo en las superficies celulares se realiza mediante dos dominios de unión a galactosa localizados en cualquier extremo del péptido (34). Cada uno de los dos sitios de unión es capaz de unirse a galactosa y más azúcares complejos en ausencia del otro sitio con un descenso no significativo en la afinidad por el ligando (35).

Se ha observado que los mutantes de la cadena B de ricina con el doble sitio de lectina expresados en células de insectos tienen unión a galactosa residual: evidencia para más de dos sitios de lectina en la cadena B de la toxina de ricina. *Bioconjugate, Chem.* Vol. 7, 651-658; Ferrini, *et al.*, 1995. Expression of functional ricin B chain using the baculovirus system. *Eur. J. Biochem.* Vol. 233, 772-777. Esto sugiere que pueden existir otros sitios de unión a la superficie celular. Una posibilidad es que las cadenas laterales de manosa en la cadena B de ricina interaccionen con los receptores de manosa en la superficie celular (véase Newton *et al.* (1992) *J Biol. Chem* 267(17):11917-11922; Frankel *et al.* (1997) *Carbohydrate Research* 300,3: 251-258).

La unión de su cadena B a la superficie celular, por ejemplo a un glicoconjugado que tiene un residuo galactosa terminal no reductor, provoca o facilita la internalización de la ricina en la célula. La internalización puede ser a través de la captación endocítica en invaginaciones de membrana ("pit") tanto recubiertas como no recubiertas (véase Frankel *et al.* (1996) *Protein Engineering* 9, 4: 371-379; Magnusson y Berg (1993) *Biochem J* 291: 749-755). Siguiendo la ruta y la liberación de la cadena A libre en el citosol, se inhibe la síntesis de proteínas celulares en células eucariotas a través de la división de un único residuo de adenina de ARN 28S eucariota en la subunidad ribosómica 60S (33). Varios documentos recientes respaldan un amplio papel para la cadena B de la toxina de ricina; se cree que el polipéptido no sólo interacciona con los residuos de galactosa de la superficie celular, sino que también puede estar implicado en el tráfico intracelular de la toxina de ricina (44). Muchos receptores que se reciclan a través de vesículas endosómicas a la superficie celular pasan a través de la región trans-Golgi. En las células, Golgi tiene la concentración más densa de sitios de unión a ricina, probablemente reflejando la concentración de galactosiltransferasas en este compartimento celular (45). Se ha observado que la toxina de ricina que entra en las células mediante la interacción con receptores terminados en galactosa se concentra en la región de Golgi (45).

Aunque en el pasado se han preparado derivados de lectina de cadena B recombinante, esto ha sido generalmente para aplicaciones terapéuticas, con el fin de aumentar la toxicidad de la cadena A. De este modo, se ha observado en muchos experimentos que las inmunotoxinas construidas con las cadenas A y B de la toxina de ricina juntas son consistentemente más tóxicas que las construidas con, por ejemplo, la cadena A de la toxina de ricina sola (véase, por ejemplo, Vitetta *et al.*, 1991, *Sem. Cell Biol.*, vol. 2, 47-58; Timar *et al.*, 1991 *Br. J. Cancer*, vol. 64, 655.662; Embleton *et al.*, 1991 *Br. J. Cancer* vol. 63, 670-674).

Por tanto, un segundo aspecto de la presente invención es una molécula de ácido nucleico que comprende

- (i) una secuencia que codifica todo o parte del polipéptido cry de Bt, y
- (ii) una secuencia que codifica todo o parte de una lectina.

Las moléculas de ácido nucleico y sus productos de polipéptido codificados según la presente invención se pueden proporcionar aisladas y/o purificadas de su medio natural, en sustancialmente una forma pura u homogénea, o libre o sustancialmente libre de ácido nucleico o genes de las especies de interés u origen diferente de la secuencia que codifica un polipéptido con la función requerida.

Ácido nucleico según la presente invención puede incluir ARNc, ARN, ADN genómico y puede ser completa o parcialmente sintético.

El término "aislado/a" comprende todas estas posibilidades. Cuando se especifica una secuencia de ADN, por ejemplo, en referencia a las SEC ID Nos 1-11 de la figura 3(a)-(k), a menos que el contexto requiera lo contrario, se comprende el ARN equivalente, con U sustituido por T cuando tenga lugar, así como secuencias degenerativamente equivalentes y complementarias.

Preferiblemente, la parte de la molécula de ácido nucleico que codifica la toxina cry de Bt comprende toda o parte de la SEC ID No: 1 (CryIA(b)) o la SEC ID No: 2 (CryIA(c)).

Preferiblemente, la parte que codifica lectina de la molécula de ácido nucleico comprende toda o parte de la SEC ID No: 3 (RTB1), SEC ID No: 4 (RTB2) o SEC ID No: 5 (RTB3); éstas derivaban de la cadena B de la toxina de ricina tal y como se describe a continuación, pero incluían mutaciones para introducir sitios de restricción.

Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico comprende la combinación CryIA-RTB mostrada en cualquiera de SEC ID No: 6 (CryIA(b)-RTB1); SEC ID No: 7 (CryIA(b)-RTB2); SEC ID No: 8 (CryIA(b)-RTB3); SEC ID No: 9 (CryIA(c)-RTB1); SEC ID No: 10 (CryIA(c)-RTB2); o la SEC ID No: 11 (CryIA(c)-RTB3).

5 Debe hacerse hincapié que la presente invención también se extiende a ácidos nucleicos que codifican variantes de moléculas de toxinas y de unión naturales, que pueden ser, por ejemplo, mutantes u otros derivados de dichas moléculas. En particular, se incluyen los ácidos nucleicos que tienen secuencias modificadas basadas en las SEC ID Nos 1 a 11⁷.

10 En cada caso, la variante codifica una toxina o producto de unión, cualquiera de ellos homólogo a una secuencia natural (por ejemplo, Cry de Bt o una lectina), y retiene la característica funcional apropiada de ese producto (por ejemplo, la toxicidad o la capacidad de unir por glicosilación, respectivamente).

15 Similitud u homología pueden ser tal como se define y se determina por el programa TBLASTN, de Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10, que es de uso habitual en la técnica, o, y esto es preferible, el programa estándar Bestfit, que es parte del Paquete Wisconsin, Versión 8, Septiembre de 1994, (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, Estados Unidos, Wisconsin 53711).

20 La homología puede ser a nivel de la secuencia de nucleótidos y/o a nivel de la secuencia de aminoácidos. Preferiblemente, la secuencia de ácidos nucleicos y/o aminoácidos comparten aproximadamente un 50%, o un 60%, o un 70%, o un 80% de homología, más preferiblemente al menos aproximadamente un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de la secuencia sobre la que se basa la variante (por ejemplo, la secuencia natural o cualquiera de las SEC ID Nos. 1 a 11).

25 La homología puede ser sobre la longitud completa de la secuencia pertinente o puede ser, más preferiblemente, sobre una secuencia contigua de aproximadamente o más grande que aproximadamente 20, 25, 30, 33, 40, 50, 67, 133, 167, 200 o más aminoácidos (o codones) en comparación con la secuencia de aminoácidos o la secuencia de nucleótidos pertinente según sea el caso.

30 Por tanto, una secuencia variante según la presente invención puede codificar, por ejemplo, en las secuencias híbridas (SEC ID Nos 6 a 11), un cambio en un único aminoácido con respecto a estas secuencias, ó 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ó 9 cambios, aproximadamente 10, 15, 20, 30, 40 ó 50 cambios o más de aproximadamente 50, 60, 70, 80 ó 90 cambios. Además de uno o más cambios en la secuencia de aminoácidos codificada por las secuencias representadas, una secuencia de aminoácidos variante codificada puede incluir aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal y/o el extremo N-terminal. Naturalmente, se incluyen cambios en el ácido nucleico que no se diferencian en la secuencia de aminoácidos codificada (es decir, "degenerativamente equivalentes").

35 La homología se puede evaluar utilizando la tecnología de hibridación (52), por ejemplo, utilizando una solución de hibridación que comprende: 5X SSC (donde "SSC" = 0,15 M de cloruro sódico; 0,15 M de citrato sódico; pH 7), 5X reactivo de Denhardt, 0,5-1,0% de SDS, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado fragmentado, 0,05% de pirofosfato sódico y hasta un 50% de formamida.

Una fórmula común para el cálculo de las condiciones de astringencia requeridas para conseguir la hibridación entre las moléculas de ácido nucleico de una homología de secuencia especificada es (52)

$$45 \quad T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 \text{ Log } [\text{Na}^+] + 0,41 (\% \text{ G} + \text{C}) - 0,63 (\% \text{ formamida}) - 600/\# \text{ pb en la cadena doble}$$

50 Como ilustración de la fórmula anterior, utilizando una $[\text{Na}^+] = [0,368]$ y un 50% de formamida, con un contenido de GC del 42% y un tamaño de sonda promedio de 200 bases, la T_m es 57°C. La T_m de una cadena doble de ADN disminuye 1-1,5°C con cada descenso del 1% en la homología. De este modo, dianas con más de aproximadamente un 75% de identidad de la secuencia se observarían utilizando una temperatura de hibridación de 42°C.

55 Particularmente útiles para ciertas aplicaciones, por ejemplo, la expresión en plantas, puede ser la alteración del uso de codones (es decir, mutación degenerativamente neutra) con el fin de ayudar en la expresión. Por ejemplo, la relación AU/GC para genes de Cry se desvía significativamente de los valores hallados para regiones codificantes de la planta y genes informadores bien expresados como *nptII*, *bar*, *gus* y *cat* (24). Una región codificante de la planta tiene habitualmente un contenido de AU de aproximadamente el 40-50%, mientras que las regiones codificantes de CryI tienen un contenido de AU del 60-64%, superando en algunas regiones el 70% (24). Además, el uso de codones de la secuencia codificante de Cry es muy diferente del uso de codones de plantas preferido (25). Existen grupos de codones desfavorables en varios sitios. Mediante la alteración del uso de codones se puede aumentar la traducción y elongación eficiente haciendo de este modo que el ARNm sea más estable para las actividades de ARNasa citoplasmática (23, 26).

65 Los mutantes tal y como se describen en la presente invención tendrán las propiedades de unión potenciadas descritas anteriormente.

Un modo posible de análisis para mutantes u otros derivados es mediante la transformación para evaluar la función en la introducción en una célula huésped capaz de expresar el ácido nucleico de la presente invención, y la posterior comparación de la viabilidad de esa célula con células transformadas con otros ácidos nucleicos. La metodología para dicha transformación y análisis, ejemplificada utilizando células de insecto SF21, se describe con más detalle a continuación. Otro procedimiento comprende el uso de plantas transgénicas que expresan el mutante o el derivado.

Los procedimientos para producir dicho mutante o derivados tal y como se ha descrito anteriormente comprenden cualquier procedimiento familiar para los expertos en la técnica.

Por tanto, un aspecto adicional es un procedimiento para producir un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión pesticida que comprende la etapa de combinar un ácido nucleico que codifica una toxina con un ácido nucleico que codifica un dominio de unión heterólogo, donde dicho dominio de unión es capaz de unirse de manera no específica a una membrana celular sin romperla.

Opcionalmente, este procedimiento puede incluir, o puede estar precedido de, etapas en las que los cambios en la secuencia de dominios de toxina o de unión se realizan de manera que producen un mutante o derivado, que puede ser mediante adición, inserción, delección o sustitución de uno o más nucleótidos en el ácido nucleico, conduciendo a la adición, inserción, delección o sustitución de uno o más aminoácidos en el polipéptido codificado.

Los cambios pueden ser deseables por una serie de razones, incluyendo la introducción o eliminación de las siguientes características: secuencias de nucleasas de restricción; otros sitios que son necesarios para la modificación posterior a la traducción; sitios de división en el polipéptido codificado; motivos en el polipéptido codificado para la glicosilación, lipilación, etc. Se pueden añadir secuencias líder y otras secuencias de señalización a la proteína expresada para determinar su localización después de la expresión. Todas estas características pueden ayudar en la clonación y expresión de manera eficiente de un polipéptido activo en forma recombinante (tal y como se describe a continuación).

Otra mutación deseable puede ser aleatoria o mutagénesis dirigida de sitio con el fin de alterar la actividad (por ejemplo, la especificidad) o la afinidad o estabilidad del polipéptido codificado.

Tal como es bien sabido, la homología del péptido se juzga en términos de la similitud o identidad de aminoácidos (en este caso con respecto al dominio de toxina y/o dominio de unión alterados).

La similitud permite la variación conservativa, es decir, la sustitución de un residuo hidrofóbico, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, o la sustitución de un residuo polar por otro, tal como arginina por lisina, glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina. Tal como es sabido por los expertos en la materia, la alteración de la estructura primaria de un polipéptido mediante una sustitución conservativa puede no alterar significativamente la actividad de ese péptido, ya que la cadena lateral del aminoácido que se inserta en la secuencia puede ser capaz de formar enlaces y contactos similares que la cadena lateral del aminoácido que se ha sustituido. Esto es muy exacto cuando la sustitución es en una región que es crítica en la determinación de la conformación de péptidos.

También se incluyen homólogos que tienen sustituciones no conservativas. Tal y como es bien conocido por los expertos en la materia, las sustituciones en regiones de un péptido que no son críticas en la determinación de su conformación pueden no afectar demasiado en su actividad, ya que no alteran demasiado la estructura tridimensional del péptido. En las regiones que son críticas en la determinación de la conformación o actividad de los péptidos, dichos cambios pueden conferir propiedades ligeramente ventajosas en el péptido, por ejemplo, una toxicidad o rango de huéspedes aún mejor.

En un aspecto de la presente invención, el ácido nucleico descrito anteriormente está en forma de un vector recombinante y preferiblemente un vector replicable.

“Vector” se define para que incluya, entre otros, cualquier plásmido, cósmico, fago o vector binario de *Agrobacterium* en forma lineal o circular de cadena simple o doble que puede ser o no auto transmisible o movilizable y que puede transformar un huésped procariota o eucariota mediante la integración en el genoma celular o existe extracromosómicamente (por ejemplo, plásmido replicante autónomo con un origen de replicación). Particularmente preferido para algunas aplicaciones son los vectores BAC o BiBAC.

Se incluyen específicamente vectores lanzadera mediante los cuales se entiende un vehículo de ADN capaz, de forma natural o mediante diseño, de la replicación en dos organismos huésped diferentes, que se pueden seleccionar entre actinomicetos y especies relacionados, bacterias y eucariotas (por ejemplo, células de plantas superiores, mamíferos, levadura o hongos).

Un vector que incluye un ácido nucleico según la presente invención no necesita incluir un promotor u otra secuencia reguladora, particularmente si el vector se utiliza para introducir el ácido nucleico en las células para la recombinación en el genoma.

Preferiblemente, sin embargo, el ácido nucleico en el vector está bajo el control de, y unido operativamente a, un promotor u otros elementos reguladores adecuados para la transcripción en una célula huésped tal como una célula

microbiana, por ejemplo bacteriana, o vegetal. El vector puede ser un vector de expresión bifuncional que funciona en múltiples huéspedes. En el caso de ADN genómico, éste puede contener su propio promotor u otros elementos reguladores y en el caso de ADNc, éste puede estar bajo el control de un promotor u otros elementos reguladores adecuados para la expresión en la célula huésped.

Por “promotor” se entiende una secuencia de nucleótidos a partir de la cual se puede iniciar la transcripción de ADN unido operativamente en dirección 3’ (es decir, en la dirección 3’ en la cadena sentido del ADN de doble cadena).

“Unido operativamente” significa unido como parte de la misma molécula de ácido nucleico, situada y orientada de forma adecuada para iniciar la transcripción a partir del promotor. El ADN está unido operativamente a un promotor está “bajo la regulación del inicio de la transcripción” del promotor.

De este modo, este aspecto de la presente invención proporciona una construcción génica, preferiblemente un vector replicable, que comprende un promotor unido operativamente a una secuencia de nucleótidos proporcionada por la presente invención tal y como se describe a continuación, tal como las Sec ID Nos. 9, 10 u 11.

En general, los expertos en la materia son capaces de construir vectores y diseñar protocolos para la expresión de genes recombinantes. Los vectores adecuados se pueden elegir o construir conteniendo las secuencias reguladoras adecuadas, incluyendo secuencias de promotor, fragmentos de terminador, secuencias de poliadenilación, secuencias de potenciador, genes marcadores y otras secuencias apropiadas. Para más detalles, véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 2nd edition, Sambrook *et al.*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

En *Current Protocols in Molecular Biology*, Second Edition, Ausubel *et al.*, eds. John Wiley and Sons, 1992 se describen en detalle muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis (ver anteriormente), secuenciación, introducción de ADN en células y la expresión génica, y el análisis de proteínas. Procedimientos y vectores específicos utilizados previamente con gran éxito en plantas se describen en Bevan (Nucl. Acids Res. 12, 8711-8721 (1984)) y Guerineau y Mullineaux (1993) (Vectores de transformación y expresión en plantas. En: *Plant Molecular Biology Labfax* (Croy RRD ed) Oxford, BIOS Scientific Publishers, pp 121-148).

De particular interés en el presente contexto son los vectores de células de insectos (por ejemplo, basados en baculovirus) y vectores de plantas.

Entre los promotores adecuados que operan en plantas se incluyen el promotor del gen 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV 35S) que se expresa en un nivel elevado en prácticamente todos los tejidos vegetales (Benfey *et al.*, 1990a y 1990b); el promotor meri 5 de la coliflor que se expresa en el meristemo apical vegetativo, así como varias posiciones bien localizadas en el cuerpo de la planta, por ejemplo, floema interna, la primordia de la flor, puntos de ramificación en la raíz y el brote (Medford, 1992; Medford *et al.*, 1991) y el promotor LEAFY de *Arabidopsis thaliana* que se expresa muy pronto en el desarrollo de la flor (Weigel *et al.*, 1992). Otros promotores incluyen el promotor de actina del arroz.

En una realización de este aspecto de la presente invención se proporciona una construcción génica, preferiblemente un vector replicable, que comprende un promotor inducible unido operativamente a una secuencia de nucleótidos proporcionada por la presente invención.

El término “inducible” aplicado a un promotor es entendido perfectamente por un experto en la materia. Esencialmente, la expresión bajo el control de un promotor inducible se “conecta” o aumenta la respuesta a un estímulo aplicado. La naturaleza del estímulo varía entre promotores. Algunos promotores inducibles provocan niveles de expresión (o sin expresión) pequeños o indetectables en ausencia del estímulo apropiado. Otros promotores inducibles provocan la expresión constitutiva detectable en ausencia del estímulo. Sea cual sea el nivel de expresión en ausencia de estímulo, se aumenta la expresión de cualquier promotor inducible en presencia del estímulo correcto. La situación preferible es cuando el nivel de expresión aumenta después de la aplicación del estímulo pertinente por una cantidad eficaz para alterar una característica fenotípica. De este modo, se puede utilizar un promotor inducible (o “conectable”) que provoca un nivel básico de expresión en ausencia del estímulo, cuyo nivel es demasiado bajo para provocar un fenotipo deseado (y de hecho puede ser cero). Después de la aplicación del estímulo, se incrementa la expresión (o se conecta) hasta un nivel que provoca el fenotipo deseado.

Un promotor inducible adecuado puede ser el promotor del gen GST-II-27 que se ha observado que es inducido por ciertos compuestos químicos que se pueden aplicar a plantas en crecimiento. El promotor es funcional en monocotiledóneas y dicotiledóneas. Por lo tanto, se puede utilizar para controlar la expresión génica en una variedad de plantas modificadas genéticamente, incluyendo cosechas del campo tales como, canola, girasol, tabaco, remolacha azucarera, algodón; cereales, tales como trigo, cebada, arroz, maíz, sorgo; frutas, tales como tomates, mangos, melocotones, manzanas, peras, fresas, plátanos y melones; y vegetales, tales como zanahoria, lechuga, col y cebolla. El promotor GST-II-27 también es adecuado para su uso en una variedad de tejidos, incluyendo raíces, hojas, tallos y tejidos reproductores. Otros promotores incluyen el promotor potatin (tubérculos) y el promotor ubiquitina (embriones de trigo).

El promotor puede incluir uno o más motivos o elementos de secuencia que confieren un control regulador del desarrollo y/o específico del tejido de la expresión.

Particularmente ventajoso en el presente contexto puede ser un promotor inducible que se conecta en respuesta a elicitores, u otras señales de las plantas que se desencadenan durante la depredación. Este sistema puede ayudar en la reducción de la posibilidad de resistencia en plagas por alimentación durante largos periodos debido a la presión de selección aplicada por plantas constitutivamente tóxicas.

La presente invención también proporciona procedimientos que comprenden la introducción de dichas construcciones en una célula vegetal y/o la inducción de la expresión de una construcción en una célula vegetal, mediante la aplicación de un estímulo adecuado, un inductor exógeno eficaz.

Los vectores descritos anteriormente se pueden introducir en huéspedes mediante cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo, conjugación, movilización, transformación, transfección, transducción o electroporación, tal y como se describe en detalle a continuación.

En un aspecto adicional de la presente invención se describe una célula huésped que contiene ácido nucleico o un vector según la presente invención, especialmente una célula vegetal, de insecto o microbiana.

Las células vegetales transformadas con el segmento de ADN que contiene la secuencia se pueden producir mediante técnicas estándar que son conocidas por expertos en la materia.

De este modo, el ADN se puede transformar en células vegetales utilizando cualquier tecnología adecuada, tal como vector plásmido Ti desarmado transportado por *Agrobacterium* que explota su capacidad natural de transferencia de genes (EP-A-270355, EP-A-0116718, NAR 12(22) 8711-87215 1984), bombardeo de partículas o microproyectiles (US 5100792, EP-A-444882, EP-A-434616), microinyección (WO 92/09696, WO 94/00583, EP 331083, EP 175966, Green *et al.* (1987) Plant Tissue and Cell Culture, Academia Press), electroporación (EP 290395, WO 8706614 Gelvin Debeyser), otras formas de captación directa de ADN (DE 4005152, WO 9012096, US 4684611), captación de ADN mediada por liposomas (por ejemplo, Freeman *et al.* Plant Cell Physiol. 29: 1353 (1984)), o el método de vórtice (por ejemplo, Kindle, PNAS U.S.A. 87: 1228 (1990d). En Oard, 1991, Biotech. Adv. 9: 1-11 se da una revisión de procedimientos físicos para la transformación de células vegetales.

La transformación con *Agrobacterium* es utilizada ampliamente por los expertos en la materia para transformar especies dicotiledóneas. Recientemente, ha habido un sustancial progreso hacia la producción habitual de plantas transgénicas estables, fértiles en casi todas las plantas monocotiledóneas económicamente relevantes (Toriyama, *et al.* (1988) Bio/Technology 6, 1072-1074; Zhang, *et al.* (1988) Plant Cell Rep. 7, 379-384; Zhang, *et al.* (1988) Theor Appl Genet 76, 835-840; Shimamoto, *et al.* (1989) Nature 338, 274-276; Datta, *et al.* (1990) Bio/Technology 8, 736-740; Christou, *et al.* (1991) Bio/Technology 9, 957-962; Peng, *et al.* (1991) International Rice Research Institute, Manila, Philippines 563-574; Cao, *et al.* (1992) Plant Cell Rep. 11, 585-591; Li, *et al.* (1993) Plant Cell Rep. 12, 250-255; Rathore, *et al.* (1993) Plant Molecular Biology 21, 871-884; Fromm, *et al.* (1990) Bio/Technology 8, 833-839; Gordon-Kamm, *et al.* (1990) Plant Cell 2, 603-618; D'Halluin, *et al.* (1992) Plant Cell 4, 1495-1505; Walters, *et al.* (1992) Plant Molecular Biology 18, 189-200; Koziel, *et al.* (1993) Biotechnology 11, 194-200; Vasil, I. K. (1994) Plant Molecular Biology 25, 925-937; Weeks, *et al.* (1993) Plant Physiology 102, 1077-1084; Somers, *et al.* (1992) Bio/Technology 10, 1589-1594; WO92/14828). En particular, la transformación mediada por *Agrobacterium* está también emergiendo ahora como un procedimiento de transformación alternativo en monocotiledóneas (Hiei *et al.* (1994) The Plant Journal 6, 271-282).

Se prefieren el bombardeo de microproyectiles, la electroporación y la captación directa de ADN cuando el *Agrobacterium* es ineficaz o inefectivo. Alternativamente, se puede utilizar una combinación de diferentes técnicas para aumentar la eficacia del proceso de transformación, por ejemplo, el bombardeo con micropartículas recubiertas de *Agrobacterium* (EP-A-486234) o el bombardeo de microproyectiles para inducir daño seguido de la cocultivación con *Agrobacterium* (EP-A-486233).

La elección particular de una tecnología de transformación se determinará por su eficacia para transformar ciertas especies de plantas, así como la experiencia y preferencia de la persona que realiza la invención con una metodología de elección particular. Será evidente para el experto en la materia que la elección particular de un sistema de transformación para introducir ácido nucleico en células vegetales no es esencial o una limitación para la invención, ni lo es la elección de la técnica para la regeneración de la planta.

Si se desea, se pueden utilizar marcadores genéticos seleccionables que consisten en genes quiméricos que confieren fenotipos seleccionables, tales como resistencia a antibióticos, tales como kanamicina, higromicina, fosfotricina, clorsulfuron, metotrexato, gentamicina, espectinomicina, imidazolinonas y glifosato.

En la técnica se han descrito una serie de plantas que han sido transformadas con genes de Bt. En particular, el maíz transgénico resistente a infestaciones extremadamente elevadas y repetidas con barrenador europeo del maíz se obtuvo utilizando una versión sintética de CryIA(b) (27). La transformación con el gen de Bt nativo no consiguió realizar la producción de niveles detectables de proteínas, mientras que aumentando el contenido de G-C de un 38% a un 65% produjo un gen que es altamente expresado en el maíz (27). Este gen de CryI(A)b tiene aproximadamente

un 65% de homología a nivel de nucleótidos con el gen nativo y se diseña para que se parezca a un gen de maíz en términos del uso de codones (27). De este modo, en aquellos aspectos de la presente invención en los que los genes de fusión pesticidas se introducen en plantas para la expresión, puede ser deseable alterar de forma correspondiente el uso de codones tal y como se describe en (27) con el fin de aumentar el rendimiento del polipéptido.

De este modo, una aspecto adicional de la presente invención proporciona un procedimiento de transformación de una célula vegetal que implica introducir un vector de la presente invención en una célula vegetal y provocar o permitir la recombinación entre el vector y el genoma de la célula vegetal para introducir la secuencia de nucleótidos en el genoma.

La presente invención comprende además una célula huésped transformada con ácido nucleico o un vector según la presente invención, especialmente una célula vegetal o microbiana. En la célula vegetal transgénica (es decir, transgénica para el ácido nucleico en cuestión), el transgén puede estar en un vector extragenómico o incorporado, preferiblemente de forma estable, en el genoma. Puede haber más de una secuencia de nucleótidos por genoma haploide.

De este modo, en una realización de este aspecto de la presente invención, se proporciona una célula vegetal que se ha incorporado en su ácido nucleico del genoma de la presente invención, bajo el control operativo de una secuencia reguladora para el control de la expresión. La secuencia codificante puede estar unida operativamente a una o más secuencias reguladoras que pueden ser heterólogas o foráneas al gen del polipéptido de fusión pesticida, es decir, asociadas de forma no natural con cualquier parte del gen para su expresión. El ácido nucleico según la presente invención puede estar colocado bajo el control de un promotor de gen inducible externamente para poner la expresión bajo el control del usuario.

En general, tras la transformación, una planta se puede regenerar, por ejemplo, a partir de células individuales, tejido de callo, o discos de hojas, como es habitual en la técnica. Casi cualquier planta se puede regenerar completamente a partir de células, tejidos y órganos de la planta. Las técnicas disponibles se revisan en Vasil *et al.*, *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol I, II y III, Laboratory Procedures and Their Applications, Academic Press, 1984, y Weissbach and Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, 1989.

La generación de plantas transgénicas fértiles se ha conseguido en los cereales arroz, maíz, trigo, avena y cebada (revisado en Shimamoto, K. (1994) *Current Opinion in Biotechnology* 5, 158-162.; Vasil, *et al.* (1992) *Bio/Technology* 10, 667-674; Vain *et al.*, 1995, *Biotechnology Advances* 13 (4): 653-671; Vasil, 1996, *Nature Biotechnology* 14 página 702).

Además de la planta regenerada, la presente invención comprende todo lo siguiente: un clon de dicha planta, semilla, progenie autorreproductora o híbrida y descendientes (por ejemplo, descendientes F1 y F2) y cualquier parte de cualquiera de ellos, tales como esquejes, semillas.

La presente invención también proporciona una propágulo de planta de dicha planta, que es cualquier parte que se puede utilizar en la reproducción o propagación, sexual o asexual, incluyendo esquejes, semillas, etcétera.

Una planta según la presente invención puede ser aquella que no desarrolla realmente una o más propiedades. Se pueden excluir variedades de plantas, particularmente variedades de plantas registrables según los Plant Breeders' Rights. Debe indicarse que una planta no tiene que considerarse como una "variedad de planta" simplemente porque contiene de forma estable en su genoma un transgén, introducido en una célula de la planta o un antecesor de la misma.

La presente invención también proporciona un procedimiento para influenciar o afectar en la toxicidad de una planta a una plaga que incluye provocar o permitir la expresión de un gen de polipéptido de fusión pesticida tal y como se ha descrito anteriormente en células de la planta.

La presente invención también proporciona un procedimiento de inclusión de la expresión de un ácido nucleico de la presente invención (por ejemplo, tal y como se muestra en la figura 3, o un mutante, alelo o derivado de esta secuencia) en células de una planta (produciendo de este modo el polipéptido codificado), después de una etapa previa de introducción del ácido nucleico en una célula de la planta o un antecesor de la misma. Dichos procedimientos influirán o afectarán a la resistencia que la planta tiene a la plaga concreta. Preferiblemente, la planta será inmune a la plaga, es decir, la plaga no consumirá o dañará la planta bajo ninguna condición conocida. Alternativamente, la resistencia puede ser alta o baja (es decir, el daño está por debajo de la media) con respecto a las plantas no transformadas.

Naturalmente, la presente invención también comprende el producto de expresión de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico descritas y procedimientos de fabricación del producto de expresión mediante la expresión a partir del ácido nucleico codificante para el mismo en condiciones adecuadas, que pueden ser en células huésped adecuadas.

Tras la expresión, el producto se puede aislar del sistema de expresión (por ejemplo, microbiano) y puede utilizarse según se desee, por ejemplo, en la formulación de una composición que incluye al menos un componente adicional (por ejemplo, portador líquido). Dichas composiciones insecticidas se pueden utilizar, por ejemplo, como pulverizadores,

particularmente en situaciones que son análogas a aquellas en que el componente toxina de la proteína de fusión se puede haber utilizado previamente.

Por lo tanto, una planta u otra especie susceptible de ser atacada por plagas tratadas con dicha composición también forman parte de la presente invención.

Alternativamente, el producto polipéptido puede realizar su función *in vivo* o *in situ*, tal y como se ha descrito anteriormente.

Por lo tanto, la presente invención también comprende un procedimiento de control de plagas que comprende la utilización de un polipéptido según la presente invención (o composición o célula huésped que lo comprende), particularmente un procedimiento de eliminación de plagas que comprende la administración, o provocar o permitir la ingestión, del polipéptido (o composición, o célula huésped que lo comprende) a las plagas.

Los polipéptidos purificados de la presente invención se pueden utilizar para desarrollar anticuerpos utilizando técnicas que son habituales en el sector. Se pueden utilizar anticuerpos y polipéptidos que comprenden fragmentos de anticuerpos que se unen a antígeno, por ejemplo, en ensayos para el polipéptido, o para marcarlo.

Los procedimientos de producción de anticuerpos incluyen inmunizar un mamífero (por ejemplo, humanos, ratón, rata, conejo, caballo, cabra, oveja o mono) con la proteína o fragmento de la misma. Los anticuerpos se pueden obtener a partir de animales inmunizados utilizando cualquiera de una serie de técnicas conocidas en el sector y se pueden cribar, preferiblemente utilizando la unión del anticuerpo al antígeno de interés.

Por ejemplo, se pueden utilizar las técnicas de transferencia Western o inmunoprecipitación (Armitage *et al.*, 1992, Nature 357: 80-82). Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Los anticuerpos se pueden modificar de varias maneras. De hecho, el término "anticuerpo" debería interpretarse que cubre cualquier sustancia de unión específica que tiene un dominio de unión con la especificidad requerida. De este modo, este término cubre fragmentos de anticuerpos, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, incluyendo cualquier polipéptido que comprende un dominio de unión a inmunoglobulina, tanto natural como sintético. Por tanto, también se incluyen las moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión a inmunoglobulina, o equivalente, fusionado a otro polipéptido. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describen en EP-A-0120694 y EP-A-0125023.

Se ha observado que fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de antígenos de unión. Los ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VI y VH de un anticuerpo individual; (iv) el fragmento dAb (Ward, E.S. *et al.*, Nature 341, 544-546 (1989) que consiste en un dominio VH; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos; (vii) moléculas Fv de cadena única (scFv), donde un dominio VH y un dominio VL están unidos por un péptido enlazador que permite que los dos dominios se asocien para formar dímeros de Fv de cadena única bispecíficos (PCT/US92/09965) y (ix) "diabodies", fragmentos multivalentes o multiespecíficos contruidos por fusión génica (WO 94/13804; P Holliger *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, 1993).

Los diabodies son multímeros de polipéptidos, comprendiendo cada polipéptido un primer dominio que comprende una región de unión de una cadena ligera de inmunoglobulina y un segundo dominio que comprende una región de unión de una cadena pesada de inmunoglobulina, estando los dos dominios unidos (por ejemplo, mediante un péptido enlazador) pero incapaces de asociarse entre sí para formar un sitio de unión a antígeno: los sitios de unión a antígeno se forman mediante la asociación del primer dominio de un polipéptido en el multímero con el segundo dominio de otro polipéptido en el multímero (WO 94/13804).

Como alternativa o complemento a la inmunización de un mamífero, los anticuerpos con una especificidad de unión adecuada se pueden obtener de una biblioteca producida recombinantemente de dominios variables expresados de inmunoglobulina, por ejemplo, utilizando bacteriófago lambda o bacteriófago filamentoso que expresan dominios de unión funcionales de inmunoglobulina en sus superficies, por ejemplo véase WO 92/01047.

En un aspecto adicional de la presente invención, se describe un procedimiento de evaluación de la toxicidad de un polipéptido para una especie concreta que comprende:

- (i) introducir un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido en una célula huésped de esa especie,
- (ii) provocar o permitir que el ácido nucleico se exprese en una célula huésped de esa especie,
- (iii) observar la viabilidad de la célula y correlacionar los resultados de la observación con la toxicidad del polipéptido.

La introducción y expresión de la toxina se puede llevar a cabo tal y como se ha descrito anteriormente. Preferiblemente, se utiliza un promotor bien caracterizado con el fin de minimizar cualquier variación en la transcripción. La viabilidad se puede evaluar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, posiblemente sólo mediante únicamente observación visual o utilizando observación EM. Sin embargo, en realizaciones preferidas, el procedimiento

comprende la utilización de un ensayo que evalúa la actividad esterasa o integridad de la membrana, por ejemplo, un ensayo basado en el homodímero de etidio 1, calceína AM o azul de tripano (véase, Molecular Probes, hoja de información del producto, kit Live/dead/citotoxicity, L-3224). El homodímero de etidio 1 y la calceína AM ensayan diferentes aspectos de la viabilidad celular - integridad de la membrana en plasma y actividad esterasa intracelular, respectivamente (40, 41).

Aunque estos fluoróforos se han utilizado previamente en ensayos de células vivas/muertas (39), no se han utilizado en relación con un ácido nucleico que codifica una toxina introducido específicamente.

Los ensayos de integridad de membrana pueden ser particularmente útiles para el ensayo de toxinas (por ejemplo, toxinas basadas en cry de Bt) que se cree que actúan en las membranas.

El formato de ensayo de la presente invención tiene una serie de características útiles - en particular el agente citotóxico no se aplica externamente. Esto elimina la necesidad de medir el agente citotóxico y su purificación.

De este modo, en el presente contexto, el polipéptido puede ser el polipéptido pesticida descrito anteriormente. La célula huésped será de una plaga apropiada, por ejemplo, una célula de insecto.

Preferiblemente, el resultado de la evaluación de la viabilidad se compara con la de una célula de control en la que la toxina no se ha expresado, pero opcionalmente en la que otros ácidos nucleicos heterólogos se han introducido. Dicha comparación mejorará la confianza con la que se puede realizar una correlación.

Los baculovirus son vectores particularmente eficaces para su uso en este procedimiento porque la síntesis de proteínas que utiliza estos vectores es temporal (Millar (1988) Ann Rev Microbiol 42: 177-199). Siendo otras cosas iguales, la concentración de proteína en el control y las células experimentales aumentará constantemente con el efecto tóxico concomitante, la severidad del cual se determinará mediante la LC_{50} de la proteína.

La presente invención se ilustrará a continuación haciendo referencia a las siguientes figuras y ejemplos no limitativos.

Figuras

Figura 1 - Construcciones en células Sf21 y plantas de arroz transgénicas. (A) Mutagénesis dirigida de sitio de la cadena B de la toxina de ricina (RTB) para derivar fragmentos 3' terminales que abarcan los dominios de unión a galactosa (rectángulos verdes). Los oligonucleótidos no emparejados LF1, LB1, LB2 y LB3 se utilizaron para introducir sitios *EcoRI* (LF1) y *HindIII* (LB1, LB2 y LB3) nuevos. Se obtuvieron tres fragmentos de RTB y se denominaron RTB1, RTB2 y RTB3, (B) Diagramas esquemáticos de los cassettes de control y fusión. Las secuencias *cryIAb* y *CryIAC* de Bt se muestran en rectángulos naranjas, y los fragmentos RTB como líneas gruesas. Las construcciones pB y pC eran los controles de Bt, las construcciones pR1, pR2 y pR3 eran los controles de RTB, y pBR1, pBR2, pBR3, pCR1, pCR2 y pCR3 eran construcciones de fusión. Se muestran los sitios de restricción sólo para pBR1, pero se aplican a todas las construcciones. Los sitios se abrevian como se indica a continuación: B = *BamHI*, Ec = *EcoRI*, Eh = *EheI*, H = *HindIII*. (C) Para la expresión en plantas transgénicas, las 11 construcciones se clonaron en el vector pAC76 que contiene el promotor ubiquitina-1 de maíz y el primer intrón, y el terminador nos. Los sitios de restricción se abrevian como se indica a continuación: Eh = *EheI*, H = *HindIII*, S = *SmaI*.

Figura 2 - Supervivencia, crecimiento y desarrollo de larvas del barrenador del tallo que se alimenta de tallos de arroz transgénico y controles. El gráfico muestra la supervivencia del insecto promedio $\pm$ SE después de 4 días (inóculo inicial de seis larvas neonatas). Cada valor representa la media de bioensayos de cuatro réplicas, excepto el control, que representa bioensayos de seis réplicas.

Figura 3 (a) a (k) - Muestran las secuencias de nucleótidos de CryIA (b & c), fragmentos del gen de la cadena B de la toxina de ricina y los genes de fusión clonados en pFASTBAC1 bajo el control del promotor de polihedrina. Las secuencias están indicadas como SEC ID Nos: 1-11. Todas las secuencias se leen en dirección 5'-3'. El codón ATG que empieza en el nucleótido 97 es el sitio de inicio de la traducción para los genes CryIA (b & c) y todos los genes de fusión. Para los fragmentos de la cadena B de la toxina de ricina, el codón ATG que empieza en la posición del nucleótido 125 sirve como sitio de inicio de la traducción. Todos los genes finalizan mediante la secuencia de poliadenilación de SV40. Se utilizan los codones de parada TAG y TAA y sus posiciones (si las secuencias se leen en dirección 5'-3') varían con el tamaño de cada gen. Si las secuencias se leen en dirección 3'-5', los codones TAG y TAA se localizan en las posiciones de nucleótidos 17 y 7, respectivamente.

Ejemplos

Materiales. Todas las endonucleasas de restricción, ligasa T_4 y todas las enzimas de restricción se obtuvieron de Boehringer Mannheim (Reino Unido). El kit de plásmido QUIAGEN y el kit de extracción de gel QUIAquick se obtuvieron de QUIAGEN. El vector de clonación pGEM-T se adquirió de Promega (Reino Unido). El homodímero de etidio 1 y la calceína AM se adquirieron de Molecular probes Europe Bv (Holanda). El vector de transferencia de baculovirus pFASTBAC1, las placas de cultivo de células de insectos TC-100 y medio, suero de ternera fetal, cellfectin y las células competentes DH10BAC se adquirieron de GIBCO BRL (Reino Unido). El gen de la cadena B de la toxina

de ricina (plásmido pWBT) y los anticuerpos contra la cadena B de la toxina de ricina utilizados en esta investigación fueron donados amablemente por el Dr. L. Roberts de la Universidad de Warwick. Los plásmidos pUBB y pUBC que contenían los genes *CryIA(b)* y *CryIA(c)* fueron donados amablemente por el Dr. I. Altosaar de la Universidad de Ottawa, Canadá, y eran tal y como se describen (Sardana, *et al.*, 1996). Todos los cebadores utilizados se sintetizaron en Genosys Biotechnologies (Inglaterra).

Ejemplo 1

Preparación del gen de la toxina

La mutagénesis dirigida de sitio del gen de la cadena B de la toxina de ricina. Se utilizaron cuatro oligonucleótidos mutagénicos en las reacciones de PCR para crear un sitio de restricción *EcoRI* y *HindIII* en las posiciones seleccionadas a lo largo del gen de la cadena B de la toxina de ricina en el plásmido pWT (Wales *et al.*, 1991) - éstos se muestran en la Figura 1A. Los cinco oligonucleótidos mutagénicos (bases mutadas subrayadas) fueron:

LF1=5' CAACAACAAAGGAATTCATGCTGATG 3'
 LB1=5' GGACACACACACTGCAAGCTTGTAATC 3'
 LB2=5' CGGATCCGAAAGCTTCACATCTAACAC 3'
 LB3=5' GCTTGCAAGCTTAGACCATATAGCCC 3'

Se llevó a cabo la mutagénesis de PCR en un volumen total de 50 ml que contenía 1x de tampón de PCR (Boehringer Mannheim), 200 mM de cada dNTP, 15 mM de $MgCl_2$, 300 nM de cada cebador, 2,6 unidades de mezcla de enzimas (Boehringer Mannheim) y 70 ng de ADN plásmido pWBT. Tras una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min, se llevaron a cabo 10 ciclos de amplificación fijos (94°C, 15 s; 65°C, 30 s; 72°C, 1 min) seguidos de otros 20 ciclos alargados de forma progresiva (94°C, 15 s; 65°C, 30 s; 72°C, 1 min; incrementando la prolongación en 5 s cada ciclo). Se llevó a cabo una última etapa de extensión a 72°C durante 7 min. Se midieron los productos del PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, se purificaron (kit de extracción de gel rápido QIA, Qiagen) y se subclonaron en el vector pGEM-T (Promega). El tamaño de inserción y la orientación se confirmaron mediante la digestión con *EcoRI* y *HindIII*.

Para confirmar la secuencia de RTB original, se llevó a cabo la secuenciación utilizando los cebadores M13/pUC19 (Gibco BRL) y el kit de secuenciación BIG DYE (Boehringer Mannheim). Se llevó a cabo la secuenciación de ciclado utilizando el ciclador térmico PTC-200 Peltier (M.J. Research Inc.).

Ejemplo 2

Preparación de la fusión en un vector de baculovirus

Visión general del sistema del baculovirus

Los baculovirus de insectos *Autographa californica* (Ac) y los virus de polihedrosis nuclear *Bombyx mori* (MNPV) habían demostrado previamente que son vectores de expresión versátiles de nivel elevado de proteínas heterólogas (6, 7, 13, 17). Esto se debe principalmente a la naturaleza única del ciclo de replicación del baculovirus, el cual implica la expresión secuencial de genes codificados por virus en cuatro fases transitorias, distintas (2, 7, 10, 18). Las tres primeras etapas dan lugar a la producción de partículas de virus infecciosas, las cuales invaden otras células y, por tanto, diseminan la infección. En la fase final, muy tardía, de la expresión génica, comenzando aproximadamente 18 horas después de la infección, las partículas de virus se obstruyen en estructuras proteináceas cristalinas llamadas polihedro (7). El gen de la polihedrina es prescindible para la producción de partículas de virus y puede reemplazarse por secuencias codificantes foráneas (7, 27). Debido a que el gen de la polihedrina se expresa en la fase tardía de la expresión del gen puede reemplazarse por secuencias que codifican proteínas tóxicas sin que afecten a la infectividad viral.

Se ha demostrado que diversas toxinas de cristal insecticidas pueden ser expresables en células de insecto infectadas por baculovirus. Se clonó el gen completo *cryIA(b)* de la proteína cristal insecticida en AcNPV, reemplazando al gen de la polihedrina (8). También se expresaron satisfactoriamente una proteína mosquitocida *CryIVD* bacteriana de longitud completa y truncada en células de lepidóptero utilizando un vector de baculovirus (11).

Clonación en un vector de transferencia de baculovirus pFASTBAC1

Se escindieron los genes *CryIAb* y *CryIAc* a partir de sus plásmidos de origen (pUBB y pUBC (46) mediante la digestión con *BamHI* y *EcoRI*, y se subclonaron en el vector de transferencia de baculovirus pFASTBAC Hb (Gibco). Los plásmidos recombinantes se digirieron con *EcoRI* y *HindIII* permitiendo la subclonación direccional de los fragmentos de gen de ricina. Se generaron seis construcciones de fusión de pFASTBAC Hb intermedias, que representan los dos genes de Bt cada uno de ellos fusionado a uno de los tres fragmentos de RTB. Éstos se digirieron con *Eco47III* y *EcoRI* (*cryIAb*) o *EcoRI* y *Xho I* (*cryIAc*), y los extremos se pulieron utilizando nucleasa de habichuela

mungero, poniendo de este modo, tras la recombinación, las regiones codificantes de Bt y RTB en el marco de lectura ("in-frame") (Figura 1). A continuación, los plásmidos recombinantes se digirieron con *Stu*I y *Hind*III, permitiendo la subclonación direccional de las construcciones de fusión en el vector pFASTBAC1 digerido de forma similar, cuyo polienlazador está flanqueado con sitios de unión Tn7. El vector pFASTBAC1 también se digirió por separado con *Bam*HI y *Eco*RI o con *Eco*RI y *Hind*III para permitir la subclonación de los dos genes de Bt no modificados y los fragmentos de RTB, respectivamente, como controles.

Transposición específica de sitio

Los vectores de transferencia pFASTBAC1 recombinantes se transformaron en células de *Escherichia coli* competentes de la cepa DH10BAC (Gibco BRL). Estas células contienen un genoma de baculovirus modificado que porta un sitio de unión Tn7, y un plásmido que proporciona una Tn7 transposasa, que permite la transposición específica de sitio de los cassettes clonados en pFASTBAC1 en el genoma de baculovirus. Se aislaron colonias blancas y a partir de ellas se purificó ADN de alto peso molecular tal y como se resume (37).

Se confirmaron los bácmidos recombinados mediante el uso de PCR y los cebadores M13/PUC19. En reacciones de PCR de 50 μ l se utilizaron cinco microlitros de 10x un tampón de PCR, un microlitro de 10x una mezcla de dNTP, 1,25 μ l de una solución madre de 10 μ M de cada cebador, 1,5 μ l de $MgCl_2$ 50 mM, 2,5 μ l de una solución al 1% del detergente W-1, un microlitro de ADN plantilla y 2,5 unidades de Taq polimerasa. Después de la incubación a 93°C durante tres minutos se realizaron 35 ciclos de PCR tal y como indica a continuación: 94°C durante 45 segundos, 55°C durante 45 segundos y 72°C durante cinco minutos (37). Se pasaron por electroforesis diez microlitros de las reacciones de PCR en un gel de agarosa al 0,8%.

Resultados de la construcción de vectores

Se obtuvieron tres delecciones terminales del gen de la cadena B de la toxina de ricina. La digestión de los vectores recombinantes de pGEM-T resultantes con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Hind*III produjo las tres delecciones esperadas del gen de cadena B de toxina de ricina, RTB1, RTB2 y RTB3. Para RTB3 (480 pares de bases, AA1-AA139) se utilizaron los cebadores de LF1xLB3; para RTB2 (739 pares de bases, AA1-AA236) se utilizaron los cebadores de LF1xLB2 y para LB1 (841 pares de bases, AA1-AA262) se utilizaron los cebadores de LF1xLB1.

A continuación, los tres fragmentos de cadena B de toxina de ricina se fusionaron con los dos genes de Bt (utilizando el sitio *Eco*RI de cada gen) para conseguir seis proteínas de fusión de traducción diferentes. Se confirmaron los seis genes de proteínas de fusión de traducción mediante la digestión con enzima de restricción (no se muestran los resultados).

A continuación, los genes de fusión se transpusieron en el genoma de baculovirus bajo el control del promotor de polihedrina. Se confirmó el éxito de la transposición específica de sitio mediante PCR utilizando los cebadores M13/PUC. Los cebadores se dirigen hacia el sitio de unión Tn7 del genoma de baculovirus. Una reacción de PCR en esta única región (sin construcción alguna) produce un fragmento de 300 pares de bases. Si esta región se transpone con un ADN de pFASTBAC1 no recombinante, una PCR en esta región utilizando cebadores M13/PUC19 produce un fragmento de ADN de 2300 pares de bases. Los resultados de la PCR (no mostrados) confirman la transposición satisfactoria de los cassettes de expresión del gen completo de la proteína de fusión de traducción tal y como se indica en el incremento correspondiente de tamaño en más de 2300 pares de bases. A continuación, los baculovirus recombinantes se transfectaron en células de insecto Sf21. El ADN de peso molecular elevado extraído de células de insecto infectadas también confirmó (mediante PCR utilizando los cebadores M13/PUC) la infección satisfactoria de las células de insecto (no se muestran los resultados).

Ejemplo 3

Producción de células huésped que expresan polipéptido de fusión pesticida

Transfección de células de insecto Sf21 con ADN de bácmido recombinante. Se sembraron un millón de células de insecto Sf21 en una placa de cultivo celular de 35 mm durante toda una noche en 2 ml de medio TC-100 suplementado con suero de ternero fetal al 10%. Las células se lavaron dos veces con medio libre de suero y antibiótico y se recubrieron con un ml de la mezcla de transfección (5 microlitros de ADN de bácmido recombinante, 800 μ l de medio TC-100 libre de suero y antibiótico y seis microlitros de cellfectin) durante cinco horas (37). Tras la extracción de la mezcla de transfección las células se cubrieron a continuación con medio TC-100 completo (suplementado con suero de ternera fetal al 10%) durante 48 horas. Se recogió el virus (primer inóculo) en el sobrenadante y las células se recubrieron con dos mililitros de medio completo durante 48 horas más y se recogió el virus (segundo inóculo). El segundo sobrenadante se utilizó como un inóculo en experimentos para determinar el tiempo óptimo de expresión de las proteínas. Para todas las infecciones, se aspiró el medio de las células y las células se recubrieron con 250 μ l de inóculo durante una hora (m.o. = 5). Al cabo de una hora se descartó el inóculo y las células se recubrieron con dos mililitros de medio TC-100 completo suplementado con suero de ternera fetal al 10%. Se analizó la expresión de la proteína durante un período de 60 horas. Al final de cada período de análisis las células se lisaron utilizando un tampón de rotura de proteínas (62,5 mM de Tris-HCl, SDS al 2%). A continuación, se cargaron quince microlitros de muestra de proteína en un gel de poliacrilamida al 12,5% y se realizó el análisis por transferencia western con anticuerpos anti-cadena B de toxina de ricina o antisueros anti-CryIA (c).

Resultado del análisis de transferencia western para la expresión de proteínas

Se analizó la expresión de la proteína de baculovirus durante un período de 60 h. Se tomaron las muestras de células a las 2, 20, 24, 34, 48 y 60 horas p.i. y se determinaron las concentraciones de proteína utilizando el método de unión con colorante (47). Se fraccionaron las muestras de proteína (20 μ g) mediante SDS-PAGE al 12,5% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond C; Amersham) utilizando la célula de transferencia semi-seca de Trans-Blot (Bio-Rad), según las instrucciones del fabricante. Se sondaron filtros con antisero contra Cry1Ab y Cry1Ac (Ms. S. Bano-Maqbool, Centre for Excellence in Plant Molecular Biology, Pakistán) o RTB (Dr. L. Roberts, Universidad de Warwick, Reino Unido). Se utilizaron IgG (Fc) anti-conejo conjugada a fosfatasa alcalina (AP) como anticuerpo secundario (Promega) y la detección se llevó a cabo según las recomendaciones del proveedor.

Para RTB1, RTB2 y RTB3 (construcciones de control que contienen sólo los fragmentos de toxinas de la ricina), la expresión de la proteína empezó aproximadamente 20 horas después de la infección y se incrementó de forma gradual hasta las 60 horas, siendo optimizada alrededor de las 34 horas. Las bandas de proteína de peso molecular menor al esperado, que representan presumiblemente productos de degradación, se detectaron a las 48 horas (RTB1), 24 horas (RTB2) y 24 horas (RTB3). De este modo la tercera delección del gen de la cadena B de la toxina de ricina, RTB3, en concreto, se presenta inestable y se degrada tras la síntesis.

En cuanto a los genes de cryIA(a) y cryIA(c) junto con las proteínas de fusión, los productos de degradación se detectaron tan pronto como a las 20 horas, sugiriendo que las proteínas eran sensibles a la degradación en células de insectos.

Ejemplo 4

*Ensayos de toxicidad in vitro**Determinación de la concentración de fluoróforo óptima*

Las concentraciones óptimas de colorante varían con los tipos de células. El siguiente experimento se realizó para averiguar la concentración de colorante más baja que produce señal suficiente. Se recogieron células de crecimiento sanas en tubos de microcentrífuga y se lavaron una vez con 1000 μ l de solución salina tamponada de fosfato de Dulbecco. La mitad de estas células se sacrificaron utilizando metanol al 30% durante 30 minutos. Utilizando muestras de células muertas y células vivas por separado, cada una de las alícuotas de las células se incubó con una concentración diferente de homodímero de Etidio 1 de 0,1 a 12,8 μ M durante 30 minutos. También se incubaron muestras separadas de células vivas y muertas con varios niveles de Calceína AM (0,1 a 12,8 μ M). Las células teñidas se visualizaron bajo un microscopio de fluorescencia convencional. Una concentración de 6,8 μ M de homodímero de Etidio 1 marcó suficientemente de rojo brillante los núcleos de las células muertas. Una concentración de 0,4 μ M de Calceína AM marcó suficientemente de verde las células vivas. A continuación, se mezclaron los dos fluoróforos para conseguir una solución que consistía en 6,8 μ M de homodímero de Etidio 1 y 0,4 μ M de Calceína AM en D-PBS y se utilizaron para teñir muestras de células muertas y vivas. A partir de estos resultados se concluyó que los dos fluoróforos en las concentraciones seleccionadas se pueden utilizar de forma fiable para evaluar la viabilidad de células infectadas.

Ensayos de viabilidad/citotoxicidad de células vivas/muertas durante 96 horas

Se sembraron un millón de células en placas de cultivo de 35 mm durante toda la noche para cada infección (siete réplicas de cada). El medio se aspiró de las células y las células se recubrieron con 250 μ l de inóculo. Las catorce infecciones diferentes que se llevaron a cabo incluían:

- (a) simulación de células de insecto infectadas con medio
- (b) células de insecto infectadas con baculovirus no recombinante
- (c) células de insecto con baculovirus recombinante que contiene el gen gus
- (d) células de insecto infectadas por separado con baculovirus recombinante que contiene la secuencia codificante de CryIA(b), CryIA(c), RTB1, RTB2 y RTB3,
- (e) células de insecto infectadas por separado con los seis genes de fusión diferentes.

Las células infectadas se lisaron y se extrajo el ADN de las mismas a las 34 horas posteriores a la infección. La composición del tampón de lisis y el procedimiento de extracción fueron los descritos por King y Possee (38). Este ADN se utilizó para verificar el éxito de la infección de las células de insecto Sf21 en reacciones PCR utilizando cebadores M13/PUC. Las células infectadas de una placa de cultivo para cada infección se analizaron para la viabilidad a las 2, 24, 34, 48, 72 y 96 horas. Las células se agruparon a 5000 xg y se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (D-PBS) de grado cultivo de tejido estéril. Las células se resuspendieron suavemente en 50 μ l del reactivo de ensayo para células vivas/muertas (6,8 μ M de homodímero de Etidio 1 y 0,4 μ M de Calceína AM, producidos en D-PBS) y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de 30 minutos, se extrajeron 40 μ l del reactivo de ensayo de las células y se descartaron. Las células si no han sido perturbadas se

depositan en el fondo de los tubos de microcentrífuga. Los restantes 10 μ l concentrados con las células se colocaron en un portaobjetos de microscopio y se fotografiaron en un microscopio de fluorescencia (485 $\pm$ 11 nm) con 400 aumentos.

El homodímero de Etidio 1 se une fuertemente a ADN y produce una fluorescencia roja intensa, pero es una molécula hidrofílica y no puede atravesar la membrana de células vivas. La Calceína AM es una molécula neutra que se difunde libremente en las células. Se divide mediante la actividad de la esterasa intracelular y produce una fluorescencia verde brillante. De este modo, el homodímero de Etidio 1 marca los núcleos de células muertas, mientras que la calceína AM marca el citosol de las células vivas.

Se tomaron dos grupos de fotografías, una para la fluorescencia del homodímero de Etidio 1 y la otra para la fluorescencia de Calceína AM, mediante la conexión alternativa de dos grupos de filtros, de manera que cada muestra celular tenía una fotografía que mostraba la proporción de células que aún están vivas (fluorescencia verde) y otra que mostraba la proporción de células que están muertas (fluorescencia roja).

Resultados de ensayos de toxicidad

Cuando se observaron bajo un microscopio de luz invertida (x400), las células infectadas con las proteínas de fusión mostraron una serie de síntomas de toxicidad tan pronto como 24 horas después de la infección. Los síntomas incluían, flotación en el medio, formas esféricas grandes y células lisadas. Algunos de los síntomas, particularmente la lisis celular, apareció después de 60 horas después de la infección en los experimentos de control. Los experimentos controlados incluían una simulación de células infectadas con medio, células infectadas sólo con baculovirus y células infectadas sólo con baculovirus recombinante que contenía el gen gus y fragmentos del gen de la cadena B de la toxina de ricina. En los ensayos de viabilidad de células vivas/muertas, en las células de insecto Sf21 infectadas con baculovirus recombinante que expresan proteínas diferentes, las células que produjeron fluorescencia verde tuvieron actividad esterasa y por tanto se evaluaron como vivas, mientras que las células que produjeron una fluorescencia roja tenían membranas comprometidas y se evaluaron como muertas.

Los resultados de los ensayos se pueden resumir como se indica a continuación:

(a) el ensayo se realizó con células de insecto Sf21 sanas. Las células no infectadas se dejaron durante 72 horas sin perturbar y sin cambio de medio. Se observaron muy pocas células muertas cuando se evaluaron tal y como se ha descrito anteriormente. Cuando las células sanas se trataron con metanol al 70% durante 30 minutos todas las células se observaron como muertas.

(b) Las células de insecto Sf21 infectadas sólo con baculovirus se evaluaron después de 2 horas, 24 horas, 34 horas y 72 horas después de la infección. Muchas células estaban aún vivas después de 72 horas.

(c) Las células de insecto Sf21 que expresaban actividad GUS se evaluaron después de 2 horas, 24 horas, 34 horas y 72 horas después de la infección. De nuevo, muchas células estaban aún vivas después de 72 horas.

(d) Las células de insecto Sf21 que expresaban CryIA(b) se evaluaron después de 2 horas, 24 horas, 34 horas y 72 horas después de la infección. Las células estaban seriamente afectadas por esta proteína entre las 34 y 72 horas.

(e) Las células de insecto Sf21 que expresaban CryIA(c) se evaluaron después de 2 horas, 24 horas, 34 horas y 72 horas después de la infección. De nuevo, las células estaban seriamente afectadas por esta proteína entre las 23 y 72 horas.

(f) Las células de insecto Sf21 que expresaban la proteína RTB1 se evaluaron después de 2 horas, 24 horas, 34 horas y 72 horas después de la infección. Muchas células estaban aún vivas después de 72 horas.

(g) Las células de insecto Sf21 que expresaban la proteína de fusión CryIA(b)-RTB1 se evaluaron después de 2 horas, 24 horas, 34 horas y 72 horas después de la infección. Las células estaban seriamente afectadas entre las 24 y 34 horas después de la infección.

(h) Las células de insecto Sf21 que expresaban la proteína de fusión CryIA(c)-RTB1 se evaluaron después de 2 horas, 24 horas, 34 horas y 72 horas después de la infección. Las células estaban seriamente afectadas entre las 24 y 34 horas.

(i) Las células de insecto Sf21 que expresaban la proteína RTB2 se evaluaron después de 2 horas, 24 horas, 34 horas y 72 horas después de la infección. Muchas células estaban aún vivas después de 72 horas.

(j) Las células de insecto Sf21 que expresaban la proteína de fusión CryIA(b)-RTB2 se evaluaron después de 2 horas, 24 horas, 34 horas y 72 horas después de la infección. En menos de 24 horas muchas células están muertas, es decir, mucho antes que en los ensayos anteriores.

(k) Las células de insecto Sf21 que expresaban la proteína de fusión CryIA(c)-RTB2 se evaluaron después de 2 horas, 24 horas, 34 horas y 72 horas después de la infección. Un número significativo de células estaban muertas en menos de 24 horas; de nuevo, antes que con la toxina sola.

(l) Las células de insecto Sf21 que expresaban la proteína RTB3 se evaluaron después de 2 horas, 24 horas, 34 horas y 72 horas después de la infección. Muchas células estaban aún vivas después de 72 horas.

(m) Las células de insecto Sf21 que expresaban la proteína de fusión CryIA(b)-RTB3 se evaluaron después de 2 horas, 24 horas, 34 horas y 72 horas después de la infección. Muchas células estaban muertas en menos de 24 horas, aunque algunas células sobrevivieron hasta las 72 horas.

(n) Las células de insecto Sf21 que expresaban la proteína de fusión CryIA(c)-RTB3 se evaluaron después de 2 horas, 24 horas, 34 horas y 72 horas después de la infección. Muchas de las células sobrevivieron hasta las 72 horas.

Los cultivos de células epiteliales de insecto no son dianas naturales para las d-endotoxinas de Bt y sus sensibilidades a la toxina son varias órdenes de magnitud inferiores a las observadas en los insectos de los que se originan²³. Sin embargo, los cultivos celulares se utilizan de forma rutinaria para estimar la actividad de toxinas de Bt contra varias especies de insectos²⁴.

Aunque los síntomas más severos se observaron en células de insecto infectadas con proteínas de fusión que contenían RTB1 y RTB2, la fusión de cualquiera de los tres fragmentos de RTB diferentes a Cry1Ab o Cry1Ac dio lugar a un gran incremento en la sensibilidad de la toxina en células Sf21 cuando se ensayó la viabilidad utilizando homodímero de Etidio 1 y Calceína AM. Los síntomas de la toxicidad se observaron aproximadamente 34 horas después de la infección. Está claro que las proteínas de fusión tienen diversos efectos citotóxicos en las células de insectos que las producen, y también está claro que la adición del gen de unión por glicosilación (cadena B de la toxina de ricina) a la toxina aumenta esta toxicidad, tal y como se mide mediante la muerte celular prematura y la mayor lisis celular.

La elección de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac y la utilización de células Sf21 se basó en observaciones anteriores de que Cry1Ab es moderadamente tóxico para las células de insecto Sf9 e IPLB-Sf21, mientras que Cry1Ac no tenía efecto en estas células (42, 43). Claramente, la adquisición de toxicidad por Cry1Ac cuando se combina con la cadena B de la toxina de ricina sugiere un papel para la unión a galactosa en la mediación de la toxicidad.

Ejemplo 5

Uso de fusiones insecticidas en plantas

Las proteínas de fusión pueden transformarse en plantas, por ejemplo maíz o arroz, tal y como se indica a continuación. La secuencia que codifica el polipéptido de fusión se inserta en un cassette de expresión bajo el control de un promotor de ubiquitina. Las plantas se transforman utilizando el bombardeo de partículas (ver por ejemplo Christenson *et al.* (1992) Plan Mol Biol 18:675-689; Christou *et al.* (1991) Bio/Technol 16: 957-962). A continuación, pueden utilizarse las plantas en bioensayos de alimentación de insectos para evaluar la toxicidad de las fusiones a nivel de todo el organismo y para medir la resistencia bajo condiciones de presión de selección variada. Las plantas pueden también evaluarse por la integración de transgenes y los patrones de expresión, y el producto de expresión puede purificarse utilizando los protocolos estándar. A continuación se ofrece un ejemplo con el arroz.

Visión general de la generación de plantas de arroz transgénicas con Bt

El callo del arroz embriogénico derivado de semilla madura se transformó con las 11 construcciones (seis fusiones y cinco controles) mostradas en la Figura 1B. Se introdujo cada construcción en tejido de arroz mediante bombardeo de partículas, junto con un vector de cotransformación que permitía la selección para la resistencia a la higromicina. Se llevó a cabo un análisis adicional en plantas que expresaban cantidades equivalentes de las 11 proteínas recombinantes. Las proteínas de fusión se expresaron de manera más eficaz en plantas de arroz transgénicas que en células de insecto infectadas con baculovirus del modo en que estaban las proteínas Bt no modificadas.

Construcciones transgénicas

Se aislaron cassettes de proteína de control y de fusión descritas anteriormente a partir de los vectores Hb pFAST-BAC intermedios utilizando *EheI* y *HindIII*, y se subclonaron direccionalmente en pAL76 (un vector de transformación basado en un promotor de ubiquitina interno) digeridos con *SmaI* y *HindIII* (Figura 1C).

Bombardeo de partículas y recuperación de plantas transgénicas

Se pelaron las semillas de arroz maduras (*Oryza sativa* L. cv Eyi 105) y se lavaron en etanol al 70% durante 2 min. Tras enjuagar en agua destilada dos veces, las semillas se esterilizaron en hipoclorito de sodio al 1,6% durante 30 minutos con suave agitación, a continuación se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril. Se germinaron las semillas bajo oscuridad en medio de inducción de callo de arroz (RCIM; medio basal MS complementado con 2,5 mg l⁻¹ 2, 4-D y solidificado con 2,5 g l⁻¹ de fitagel). Tras 7 días, se diseccionó el callo derivado del escutelo a partir de las semillas germinantes y se cultivó bajo oscuridad en medio osmótico (RCIM complementado con 36 g l⁻¹ de sorbitol y 36 g l⁻¹ de manitol (48) durante 4 h. A continuación, se bombardeó el callo con partículas de oro de 0,95 mm de diámetro recubiertas de ADN. El bombardeo se llevó a cabo dos veces con un intervalo 4 horas, y se cobombardeó el callo con uno de los 11 plásmidos que contienen las construcciones de fusión o de control y un plásmido de

cotransformación que contiene un marcador que confiere resistencia a la higromicina (49), en una proporción molar de 1:3. Los procedimientos del recubrimiento de partículas y bombardeo se describieron anteriormente (50, 51). Tras el segundo bombardeo, se incubó el callo bajo oscuridad en el medio osmótico durante unas 16 h más y, a continuación, se transfirió a RCIM durante tres días. A continuación, se transfirió el callo a un medio de selección (RCIM complementado con 30 mg l⁻¹ de higromicina B) durante 4 semanas. Los subcultivos se llevaron a cabo en intervalos de 2 semanas. Se transfirió el callo resistente a la higromicina a un medio HRSM1 bajo la luz del día (medio basal MS complementado con 30 g l⁻¹ de maltosa, 2 mg l⁻¹ de BAP, 0,5 mg l⁻¹ de NAA, 30 mg l⁻¹ de higromicina B y 5 g l⁻¹ de goma gellan gelrite) para iniciar la regeneración del brote. Tras una semana, se transfirió el callo regenerante a un medio HRSM2 (igual que HRSM1 pero con sólo 2,5 g l⁻¹ de goma gelrite gellan) y se cultivó bajo las mismas condiciones. Se transfirieron los sistemas de brote completamente regenerados a un medio de arraigamiento HRRM (1/2 medio basal MS complementado con 10 g l⁻¹ de sacarosa). Las plantas maduras se transfirieron al invernadero.

Análisis RT-PCR

Se extrajo el ARN total a partir de 100 mg de tejido de hoja de plantas de arroz transformadas y de tipo natural utilizando el kit RNeasy Plant Mini (Qiagen) según las recomendaciones del proveedor. Se llevaron a cabo las RT-PCRs utilizando el kit Access-PCR (Promega) según las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 100 ng de ARN total y 50 pmol de cada cebador. Los cebadores CRF1 y CRR1 amplifican tanto a *cryIAb* como *cryIAc*, mientras que los cebadores RTF1 y RTR1 amplifican el fragmento del gen de RTB. Las secuencias de los cebadores fueron las siguientes: CRF1 (5'-CGCATTGAAAC CGGTTACTCC CCA-3'), CRR1 (5'-CTTGGGCAGAACCGGAAGCTACC-3'), RTF1 (5'-GATGTTTGTATGGATCCTCAGCCCA-3') y RTR1 (5'-GCCGAACAATGGTTGTAACAAAAGG-3').

Transferencia northern

Se extrajo el ARN total tal y como se ha descrito anteriormente, y se fraccionaron 15 mg de alícuotas mediante electroforesis en geles de agarosa-formaldehído al 1% y se transfirieron a filtros de nitrocelulosa según los procedimientos estándar (52). Se marcaron los fragmentos de *Bam*HI/*Eco*RI de 1,8 kbp correspondientes a las regiones codificantes *cryIAb* y *cryIAc*, para su uso como sondas.

Análisis de transferencia Western

El análisis por transferencia Western de las plantas transgénicas se llevó a cabo en pequeñas secciones de hoja molidas hasta un polvo fino bajo nitrógeno líquido. Se dispersaron las muestras en tampón de extracción de proteínas (100 mM Tris.Cl pH 8,1, 100 mM de 2-mercaptoetanol) y se centrifugaron a 12.000 x g durante 10 min a 4°C. Se llevó a cabo el SDS-PAGE utilizando muestras de 30 mg, y se llevaron a cabo los procedimientos de transferencia y detección tal y como se ha descrito anteriormente.

Los análisis de los patrones de bandas en las transferencias western sugirieron que las proteínas de fusión que contenían el fragmento más largo de RTB (RTB1) eran las más estables. Los fragmentos de RTB de control también se expresaron de forma eficaz en plantas de arroz transgénicas. Se confirmó la presencia de ARNs de transgenes en las plantas mediante el análisis de transferencia northern y RT-PCR (no se muestran los datos).

De este modo queda claro que las proteínas de fusión se expresaron de manera eficaz en plantas de arroz transgénicas.

Ejemplo 6

Bioensayos en insectos

Visión general de bioensayos en insectos

Los bioensayos en insectos se realizaron utilizando secciones de tallo de plantas de control de tipo natural y líneas transgénicas individualmente transformadas con nueve de las 11 construcciones (seis funciones y cinco controles) mostradas en la figura 1B. Las plantas transformadas con pR2 o pR3 (construcciones de control que contenían los fragmentos de RTB más cortos) no se ensayaron. El efecto de estas proteínas de control y de fusión se determinó en una plaga del arroz económicamente importante, el barrenador de tallo rayado.

Bioensayos en insectos

Se obtuvo un cultivo de huevos de barrenador de tallo rayado (*Chilo suppressalis*) del Dr M. Cohen, Internacional Research Institute, Filipinas. Los huevos se mantuvieron a un régimen de temperaturas de 27/25°C día/noche con un fotoperiodo de 16 horas. Los insectos se mantuvieron bajo una licencia MAFF EPHL 51/2595 (3/1998). Las plantas de arroz se desarrollaron y mantuvieron en condiciones idénticas.

Los bioensayos se llevaron a cabo en secciones de tallo de transformantes primarios y controles de tipo natural. Se cada planta se sacó una sección única de tallo de 7 cm de longitud con al menos un nodo. Las secciones se colocaron en papel de filtro húmedo en placas y se infestaron con larvas de barrenador de tallo recién nacidas (menos de 2 horas de vida) mediante la colocación de tres en cada extremo de las secciones cortadas para facilitar la entrada en el tallo.

Se establecieron cuatro réplicas para cada línea, a excepción del control de tipo natural, donde se utilizaron ocho réplicas. Las placas se sellaron a continuación con Parafilm y se dejaron durante 4 días en una cámara de crecimiento controlado en las condiciones especificadas anteriormente. Después del periodo de prueba, las secciones del tallo se diseccionaron bajo un microscopio binocular y se registraron la supervivencia de los insectos, el desarrollo y el peso.

5 El análisis estadístico de los datos del insecto se realizó con el software Statview v. 5.0 (Abacus Concepts, CA). El análisis de la varianza (ANOVA) se utilizó para ensayar las diferencias significativas entre los tratamientos. Se utilizó un límite de rechazo de $p > 0,05$.

Resultados

10 Los resultados se muestran en la figura 2. La supervivencia de los insectos en las secciones de tallo de control de tipo natural fue superior al 95%.

15 En plantas que expresaban las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac, la supervivencia de los insectos disminuyó hasta entre el 55 y el 80% (valores promedio del 79% (Cry1Ab) y el 71% (Cry1Ac)). Los datos sugirieron que Cry1Ac era ligeramente más tóxico hacia el barrenador de tallo que Cry1Ab, aunque la diferencia no era estadísticamente significativa. No hubo un efecto significativo en la supervivencia de insectos en la línea pR1, que expresaba el fragmento de control RTB1, aunque las larvas que sobrevivieron mostraron un crecimiento dañado (ver a continuación).

20 Con la excepción de las plantas transformadas con la construcción pBR3, el promedio de supervivencia de los insectos en todas las plantas que expresaban proteínas de fusión fue significativamente inferior a la de las plantas de tipo natural de control y las plantas que expresaban proteínas de control.

25 Las plantas transformadas con las construcciones pCR1, pCR2 y pCR3 eran altamente resistentes al barrenador de tallo, con mortalidades en los insectos del 87%, 74% y 61%, respectivamente.

Los resultados para las plantas transformadas con las construcciones pBR1, pBR2 y pBR3 fueron más variables, con una supervivencia en el intervalo del 30 al 50%, y pBR2 era la más eficaz.

30 Las larvas supervivientes mostraron un crecimiento dañado y una detención en el desarrollo en todas las líneas transgénicas. El promedio del peso de las larvas cayó en un 30% en las plantas que expresaban las proteínas de Bt de control y el fragmento RTB de control. La detención en el desarrollo fue más severa en plantas que expresaban Cry1Ac que en plantas que expresaban Cry1Ab.

35 De las proteínas de fusión de Cry1Ab, sólo pBR1 tuvo un efecto significativamente superior que la proteína de Bt de control Cry1Ab, provocando una reducción del 60% en el peso promedio de las larvas. Las reducciones severas en el crecimiento de las larvas y el desarrollo también se observaron en las plantas que expresaban pCR1, pCR2 y pCR3. Los resultados con pCR2 y pCR3 fueron similares a los de pBR1, pero pCR1 fue de nuevo la construcción más eficaz, provocando un descenso en el peso promedio de las larvas superior al 80% y evitando el desarrollo más allá del primer estadio.

40 De este modo, las plantas de arroz transgénicas que expresaban las proteínas de fusión estaban totalmente protegidas contra la alimentación por el barrenador de tallo rayado, provocando una mortalidad en los insectos del 55-80% y un escaso crecimiento y desarrollo detenido en las larvas supervivientes. La proteína de fusión más tóxica fue pCR1.

45 Después de cuatro días la mortalidad de los insectos fue del 87% y la detención en el desarrollo en la primera etapa del estadio en las larvas supervivientes. Después de cuatro días, las larvas que se alimentaban de plantas de arroz de tipo natural habían conseguido el tercer estadio y no habían causado un daño significativo a los tallos. En cambio, las larvas que se alimentaban de plantas transgénicas que expresaban las proteínas de fusión no provocaron un daño significativo. Por tanto, la adición de un dominio de unión a galactosa a las toxinas de Bt mejoró significativamente su

50 actividad contra el barrenador de tallo rayado.

Conclusiones

55 Estos ejemplos muestran claramente que un dominio de unión heterólogo que es no tóxico *per se*, pero que es capaz de unirse de manera no específica a una membrana celular sin romper dicha membrana (por ejemplo, la cadena B de la toxina de ricina) cuando se combina con una toxina (por ejemplo, las d-endotoxinas Cry1Ab y Cry1Ac), puede incrementar el rango de interacciones moleculares disponibles para las toxinas, ampliando potencialmente de este modo el espectro de su actividad. En particular, los Ejemplos muestran un aumento de la toxicidad en comparación con la toxina no modificada tanto *in vitro* (hacia células Sf21) como *in vivo* (hacia el barrenador de tallo rayado).

60 Adicionalmente, la adición de un dominio de unión nuevo es probable que retrase o evite la evolución de la resistencia en poblaciones de insectos, ya que es menos probable que los insectos experimenten mutaciones que eliminan dos o más actividades de captación celular distintas.

Ejemplo 7

*Unión de lectinas, toxina de Bt y fusiones de Bt-lectina a polipéptidos de intestinos de insecto*5 *Metodología*

Brevemente, se diseccionaron los intestinos de dos plagas de insectos del arroz, el barrenador de tallo rayado utilizado para los bioensayos de insectos descritos anteriormente, y una especie homóptera, el saltamontes marrón del arroz (*Nilaparvata lugens*). Se separaron los polipéptidos de intestinos extraídos mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, se transfirieron y se sondaron con lectinas, toxina de Bt, o proteína de fusión de Bt-lectina; a continuación se detectó la sonda unida mediante el anticuerpo específico adecuado.

En detalle, en primer lugar se expresó en *E. Coli* una construcción que codifica una fusión marcada con His de dominio 1 de la toxina Cry1Ac de Bt y lectina de campanilla blanca (GNA) (designada como JD1). Tras la solubilización se purificó la proteína de fusión mediante cromatografía en perlas de agarosa Ni-NTA (Qiagen), se dializó para extraer los desnaturalizantes y se concentraron mediante ultrafiltración para proporcionar una preparación de proteína soluble y funcional. Se diseccionaron los intestinos medios de saltamontes marrón (*Nilaparvata lugens*) a partir de insectos recogidos recientemente de plantas de arroz y se homogeneizaron en tampón de muestra de SDS mediante sonicación. Se recogieron los intestinos medios de barrenador de tallo rayado (proporcionado por el Dr. Mike Cohen, IRRI) a partir de la larva de estadio tardío y se trataron de forma similar. A continuación, se separó la proteína solubilizada de los intestinos mediante SDS-PAGE (acrilamida al 12,5%) y se transfirió a membranas de nitrocelulosa. La cantidad de proteína cargada era equivalente a 1,5 intestinos por carril para el saltamontes marrón; para el barrenador de tallo rayado se cargó con aproximadamente 5 µg de proteína por carril. Tras la incubación en reactivos de bloqueo (Sigma) durante 60 minutos, se sondaron las membranas que contenían las proteínas de los intestinos mediante incubación con JD1, Cry1Ac (una donación del Dr. David Ellar; se activó la protoxina mediante tratamiento con tripsina tal y como se ha descrito (53), GNA (Drs. W. Peumans y E. van Damme, Universidad Católica de Leuven, Bélgica) o aglutinina de *Ricinus communis* (Sigma), respectivamente. Se llevó a cabo la incubación durante 60 minutos a 25°C, a una concentración de 1 µg ml⁻¹. Se lavaron las membranas tres veces, 5 min por lavado, con 20 ml de solución salina-Tritón tamponado con Tris (TBS-T; 50 mM de tampón Tris-HCl, pH 7,2, que contenía 0,15 M de NaCl y un 0,1% de Triton X-100). A continuación, se detectó la unión a ligando mediante la incubación con el anticuerpo primario apropiado (anti-Cry1Ac, gentileza del Dr. David Ellar; anti-GNA, producido por los autores; anti-aglutinina de *Ricinus communis*, Vector Labs) en TBS-T a una dilución de 1:10.000 durante 60 minutos a 25°C. Se lavó la membrana de nuevo tal y como se hizo anteriormente y se incubó con el anticuerpo secundario (conjugado a HRP; Bio-Rad) a una dilución de 1:5000. De nuevo se lavó la membrana tal y como se hizo anteriormente y se enjuagó además en agua destilada dos veces antes de añadir los reactivos de ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido), y la mancha ("blot") se expuso a una película de rayos-X siguiendo las instrucciones del fabricante.

Resultados

La combinación de la lectina de *Ricinus communis* como sonda y los anticuerpos de lectina anti-*Ricinus communis* como reactivo de detección mostró una unión fuerte a un gran número de polipéptidos en los extractos de tejidos de intestinos de ambos insectos. En contraste, la sonda de la proteína de Cry1Ac sólo se unió fuertemente a un polipéptido en los mismos extractos (aproximadamente 45 kDa en el barrenador de tallo rayado y 90 kDa en el saltamontes marrón). Para caracterizar con mayor profundidad las diferencias en la unión entre la toxina de Bt y una fusión de Bt-lectina, se fabricó una proteína de fusión entre la lectina específica de unión a manosa de campanilla blanca (aglutinina de *Galanthus nivalis*; GNA) y Cry1Ac mediante la expresión de una construcción génica adecuada en *E. coli*. A continuación, se comparó por separado la unión de la proteína de fusión a los polipéptidos de los intestinos del insecto con la de las proteínas GNA y Cry1Ac. De acuerdo con los resultados previos, la GNA se unió fuertemente a los polipéptidos de aproximadamente 75 kDa (2 bandas) y 50 kDa extraídos del intestino del saltamontes marrón del arroz, y se unió fuertemente a un polipéptido de aproximadamente 80 kDa de intestino de barrenador de tallo rayado. La GNA también se unió a un polipéptido de 45 kDa en extractos de intestinos de barrenador de tallo, un peso molecular parecido a la de la banda principal detectada por Cry1Ac. La fusión GNA-Cry1Ac solamente se unió muy débilmente al polipéptido de 85 kDa reconocido por la GNA en los intestinos del barrenador de tallo rayado, pero se unió al polipéptido de 45 kDa reconocido tanto por la GNA como por la toxina Cry1Ac. Por otro lado, la fusión mostró unión con todos los polipéptidos principales reconocidos por la GNA y por las toxinas Cry1Ac en extractos de intestinos de saltamontes marrón (de aproximadamente 90 kDa, 75 kDa y 45 kDa). Estos resultados muestran que las fusiones de lectina-Bt tienen diferentes especificidades de unión a los polipéptidos extraídos de tejidos de intestinos de insectos, en comparación con la toxina de Bt de la cual derivan.

60 *Discusión*

En los experimentos anteriores, se permitió que las lectinas purificadas, las toxinas de Bt y las proteínas de fusión de Bt-lectina reaccionaran con polipéptidos extraídos de intestinos de insectos. Los resultados mostraron que el dominio de unión a galactosa en la ricina se une fuertemente a muchos más polipéptidos en extractos de intestinos de insectos que en la toxina de Cry1Ac. La naturaleza bifuncional de la unión de las proteínas de fusión de lectina-Bt (es decir con las propiedades de unión que se derivan a partir de ambos dominios de proteína que contribuyen) se observó directamente mediante ensayos de unión con una proteína de fusión GNA-Cry1Ac purificada en polipéptidos de intestinos de insectos.

Referencias

1. **Monette et al.** (1997). *Applied and Environmental Microbiology* 63 (2), 440-447.
- 5 2. **Luckow**, (1991). *Cloning and expression of heterologous genes in insect cells with baculovirus vectors*, p. 97-151.
- Prokop et al.**, (Ed), *Recombinant DNA technology and applications*. McGraw-Hill, New York, NY.
- 10 3. **Ferrini et al.**, (1995) *European Journal of Biochemistry* 233, 772-777.
4. **Ge et al.**, (1991). *The Journal of Biological Chemistry* 266 (27), 17954-17958.
5. **Schnepf and Whitley**, (1985). *The Journal of Biological Chemistry* 260, (10), 6273-6280.
- 15 6. **Dean et al.**, (1996) *Gene* 179, 111-117.
7. **Weyer et al.**, (1990). *Journal of General Virology* 71, 1525-1534.
- 20 8. **Martens et al.**, (1990). *Applied and Environmental Microbiology* 56 (9), 2764-2770.
9. **Merryweather et al.**, (1990). *Journal of General Virology* 71, 1535-1544.
10. **Miller**, (1988). *Annual Review of Microbiology* 42, 177-199.
- 25 11. **Pang et al.**, (1992). *Journal of General Virology* 73, 89-101.
12. **Hofmann et al.**, (1988). *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 85, 7844-7844.
- 30 13. **Vadlamudi et al.**, (1995). *The Journal of Biological Chemistry* 270 (10) 5490-5494.
14. **Lee et al.**, (1996). *Applied and Environmental Microbiology* 62 (8) 2845-2849.
15. **Masson et al.**, (1995). *The Journal of Biological Chemistry* 270 (35), 20309-20315.
- 35 16. **Tabashnik et al.**, (1997). *Proc.Natl. Acad. Sci.* 94, 1640-1644.
17. **Tabashnik**, (1994). *Annual Review of Entomology* 39, 47-79.
- 40 18. **Tabashnik et al.** *Applied and Environmental Microbiology* 62 (8) 2839-2844.
19. **Perlak et al.**, (1990). *Bio/Technology* 8, 939-943.
20. **Vaek et al.**, (1989). *Cell Cult. Somatic Genet. Plants* 6, 425-439.
- 45 21. **Vaek et al.**, (1987). *Nature* 327, 33-37.
22. **Cornelissen**, (1989). *Nucleic Acids Research* 17, 7203-7209.
- 50 23. **Perlak et al.**, (1991). *Proc.Natl.Acad.Sci* 88, 3324-3328.
24. **Arsine et al.**, (1995). *Plant Molecular Biology* 28, 513-524.
25. **Murray et al.**, (1989). *Nucleic Acids Research* 17, 477-498.
- 55 26. **Wolin and Walter**, (1988). *Embo Journal* 7, 3559-3569.
27. **Koziel et al.**, (1993). *Bio/Technology* 11, 194-199.
- 60 28. **Dellaporta and Calderon-Urrea**, (1994). *Science* 266, 1501-1505.
29. **Irish**, (1996). *BioEssays* 18 (5), 363-369.
30. **Heslop-Harrison**, (1961). *Proc.Linn.Soc.*, London. 172, 108-123.
- 65 31. **Hansen et al.**, (1976). *Crop Science*. 16, 371-374.
32. **Morino et al.**, (1995). *Biol.Pharm.Bull.* 18 (12) 1770-1772.

33. **Endo** and **Tsurugi**, (1987). *J.Biol.Chem.* 262, 8128.

34. **Wales et al.**, (1992). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 294 (1), 291-296.

35. **Wales et al.**, (1991). *The Journal of Biological Chemistry* 266 (29), 19172-19179.

36. **Sardana et al.**, (1996). *Plant Cell Reports* 15, 677-681.

37. **GIBCO** (1996). BAC-TO-BAC™ baculovirus expression systems: Instruction Manual, 1-33.

38. **King** and **Possee**, (1990). The baculovirus expression system: A laboratory guide. *Chapman and Hall*, 143-144.

39. Molecular probes product information sheet, live/dead viability/cytotoxicity kit (L-3224), pp1.

40. **Glaze** and **Rye** (1992) *Nature* 359: 859-861.

41. **Bell et al** (1988) *J. Orthopaedic Res.* 6: 467-474.

42. **Johnson** (1994) *J. Invertebr. Pathol.* 63: 123-129.

43. [ver 1]

44. **Newton et al** (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 11917-11922.

45. **Gonatas et al** (1975) *Exp. Cell Res.* 94: 426-431.

46. [ver 36]

47. **Bradford** (1976) *Annal. Biochem.* 72: 248-254.

48. **Vain et al** (1993) *Plant Cell Rep.* 12: 84-88.

49. **Cooley et al** (1995) *Theoret. Appl. Genet.* 90, 97-104.

50. **Klein et al** (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 4305-4309

51. **Sudhakar et al** (1998) *Transgenic Res.* 7: 289-294

52. **Sambrook et al** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second edition, *Cold Spring Harbour Lab. Press.*

53. **Knight et al** (1994) *Mol. Microbiol.* 11: 429-436.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante se muestra únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de Patente Europea. Aunque se ha tenido una gran precaución a la hora de recopilar las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes declina cualquier responsabilidad al respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 9117254 A, The regents of the university of California [0011]
- WO 9818820 A, University Southern Carolina [0014]
- WO 9610083 A, CIBA-GEIGY [0015]
- US 5668255 A, Murphy [0016]
- US 5763245 A, Greenplate [0017]
- EP 270355 A [0087]
- EP 0116718 A [0087]

- US 5100792 A [0087]
- EP 444882 A [0087]
- 5 • EP 434616 A [0087]
- WO 9209696 A [0087]
- WO 9400583 A [0087]
- 10 • EP 331083 A [0087]
- EP 175966 A [0087]
- 15 • EP 290395 A [0087]
- WO 8706614 A [0087]
- DE 4005152 [0087]
- 20 • WO 9012096 A [0087]
- US 4684611 A [0087]
- 25 • WO 9214828 A [0088]
- EP 486234 A [0089]
- EP 486233 A [0089]
- 30 • EP 0120694 A [0110]
- EP 0125023 A [0110]
- 35 • US 9209965 W [0111]
- WO 9413804 A [0111] [0112]
- WO 9201047 A [0113]
- 40 • GB 0001633 W [0176]
- GB 9909796 A [0176]
- 45 **Documentos que no son patentes citados en la descripción**
 - DE **MAAGD** *et al.* *Appl Env Microb*, 1996, vol. 62 (5), 1537-1543 [0012]
 - 50 • **STIRPE** *et al.* Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 405-412 [0033]
 - **BARBIERI** *et al.* Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1993, vol. 1154, 237-282 [0033]
 - 55 • **BIOCONJUGATE, CHEM.** Bioconjugate, *Chem.*, vol. 7, 651-658 [0036]
 - **FERRINI** *et al.* Expression of functional ricin B chain using the baculovirus system. *Eur. J. Biochem.*, 1995, vol. 233, 772-777 [0036]
 - 60 • **NEWTON** *et al.* *J Biol Chem*, 1992, vol. 267 (17), 11917-11922 [0036]
 - **FRANKEL** *et al.* *Carbohydrate Research*, 1997, vol. 300 (3), 251-258 [0036]
 - **FRANKEL** *et al.* *Protein Engineering*, 1996, vol. 9 (4), 371-379 [0037]
 - 65 • **MAGNUSSON; BERG.** *Biochem J*, 1993, vol. 291, 749-755 [0037]
 - **VITETTA** *et al.* *Sem. Cell Biol.*, 1991, vol. 2, 47-58 [0038]

ES 2 298 140 T3

- **TIMAR** *et al. Br. J. Cancer*, 1991, vol. 64, 655-662 [0038]
- **EMBLETON** *et al. Br. J. Cancer*, 1991, vol. 63, 670-674 [0038]
- 5 • **ALTSCHUL** *et al. J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403-10 [0048]
- **SAMBROOK** *et al. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989
- *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, 1992 [0075]
- 10 • **BEVAN**. *Nucl. Acids Res.*, 1984, vol. 12, 8711-8721 [0075]
- Plant transformation and expression vectors. **GUERINEAU**; **MULLINEAUX**. *Plant Molecular Biology Labfax. BIOS Scientific Publishers*, 1993, 121-148 [0075]
- 15 • **NAR**, 1984, vol. 12 (22), 8711-87215 [0087]
- **GREEN** *et al. Plant Tissue and Cell Culture. Academic Press*, 1987 [0087]
- 20 • **FREEMAN** *et al. Plant Cell Physiol.*, 1984, vol. 29, 1353 [0087]
- **KINDLE**. *PNAS U.S.A.*, 1990, vol. 87, 1228 [0087]
- **OARD**. *Biotech. Adv.*, 1991, vol. 9, 1-11 [0087]
- 25 • **TORIYAMA** *et al. Bio/Technology*, 1988, vol. 6, 1072-1074 [0088]
- **ZHANG** *et al. Plant Cell Rep.*, 1988, vol. 7, 379-384 [0088]
- 30 • **ZHANG** *et al. Theor Appl Genet*, 1988, vol. 76, 835-840 [0088]
- **SHIMAMOTO** *et al. Nature*, 1989, vol. 338, 274-276 [0088]
- 35 • **DATTA** *et al. Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 736-740 [0088]
- **CHRISTOU** *et al. Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 957-962 [0088]
- **PENG** *et al. International Rice Research Institute, Manila, Philippines*, 1991, 563-574 [0088]
- 40 • **CAO** *et al. Plant Cell Rep.*, 1992, vol. 11, 585-591 [0088]
- **LI** *et al. Plant Cell Rep.*, 1993, vol. 12, 250-255 [0088]
- 45 • **RATHORE** *et al. Plant Molecular Biology*, 1993, vol. 21, 871-884 [0088]
- **FROMM** *et al. Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 833-839 [0088]
- **GORDON-KAMM** *et al. Plant Cell*, 1990, vol. 2, 603-618 [0088]
- 50 • **D'HALLUIN** *et al. Plant Cell*, 1992, vol. 4, 1495-1505 [0088]
- **WALTERS** *et al. Plant Molecular Biology*, 1992, vol. 18, 189-200 [0088]
- 55 • **KOZIEL** *et al. Biotechnology*, 1993, vol. 11, 194-200 [0088]
- **VASIL**, I. K. *Plant Molecular Biology*, 1994, vol. 25, 925-937 [0088]
- **WEEKS** *et al. Plant Physiology*, 1993, vol. 102, 1077-1084 [0088]
- 60 • **SOMERS** *et al. Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 1589-1594 [0088]
- **HIEI** *et al. The Plant Journal*, 1994, vol. 6, 271-282 [0088]
- Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. **VASIL** *et al. Laboratory Procedures and Their Applications. Academic Press*, 1984, vol. I, II an [0096]
- 65 • **WEISSBACH**; **WEISSBACH**. *Methods for Plant Molecular Biology. Academic Press*, 1989 [0096]

- **SHIMAMOTO**, K. *Current Opinion in Biotechnology*, 1994, vol. 5, 158-162 [0097]
- **VASIL** *et al.* *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 667-674 [0097]
- 5 • **VAIN** *et al.* *Biotechnology Advances*, 1995, vol. 13 (4), 653-671 [0097]
- **VASIL**. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 702 [0097]
- **ARMITAGE** *et al.* *Nature*, 1992, vol. 357, 80-82 [0110]
- 10 • **WARD**, E.S. *et al.* *Nature*, 1989, vol. 341, 544-546 [0111]
- **BIRD** *et al.* *Science*, 1988, vol. 242, 423-426 [0111]
- 15 • **HUSTON** *et al.* *PNAS USA*, 1988, vol. 85, 5879-5883 [0111]
- **P HOLLIGER** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0111]
- **MILLER**. *Ann Rev Microbiol*, 1988, vol. 42, 177-199 [0121]
- 20 • **CHRISTENSON** *et al.* *Plant Mol Biol*, 1992, vol. 18, 675-689 [0150]
- **CHRISTOU** *et al.* *Bio/Technol*, 1991, vol. 16, 957-962 [0150]
- 25 • **DRS. W. PEUMANS; E. VAN DAMME**. *Catholic University of Leuven* [0172]
- **MONETTE** *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, vol. 63 (2), 440-447 [0175]
- Cloning and expression of heterologous genes in insect cells with baculovirus vectors. **LUCKOW** *et al.* *Recom-*
30 *binant DNA technology and applications. Mc-Graw-Hill*, 1991, 97-151 [0175]
- **FERRINI** *et al.* *European Journal of Biochemistry*, 1995, vol. 233, 772-777 [0175]
- **GE** *et al.* *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, vol. 266 (27), 17954-17958 [0175]
- 35 • **SCHNEPF; WHITLEY**. *The Journal of Biological Chemistry*, 1985, vol. 260 (10), 6273-6280 [0175]
- **DEAN** *et al.* *Gene*, 1996, vol. 179, 111-117 [0175]
- 40 • **WEYER** *et al.* *Journal of General Virology*, 1990, vol. 71, 1525-1534 [0175]
- **MARTENS** *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, vol. 56 (9), 2764-2770 [0175]
- **MERRYWEATHER** *et al.* *Journal of General Virology*, 1990, vol. 71, 1535-1544 [0175]
- 45 • **MILLER**. *Annual Review of Microbiology*, 1988, vol. 42, 177-199 [0175]
- **PANG** *et al.* *Journal of General Virology*, 1992, vol. 73, 89-101 [0175]
- 50 • **HOFMANN** *et al.* *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 1988, vol. 85, 7844-7844 [0175]
- **VADLAMUDI** *et al.* *Journal of Biological Chemistry*, 1995, vol. 270 (10), 5490-5494 [0175]
- **LEE** *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, vol. 62 (8), 2845-2849 [0175]
- 55 • **MASSON** *et al.* *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, vol. 270 (35), 20309-20315 [0175]
- **TABASHNIK** *et al.* *Proc.Natl. Acad. Sci.*, 1997, vol. 94, 1640-1644 [0175]
- 60 • **TABASHNIK**. *Annual Review of Entomology*, 1994, vol. 39, 47-79 [0175]
- **TABASHNIK** *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62 (8), 2839-2844 [0175]
- **PERLAK** *et al.* *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 939-943 [0175]
- 65 • **VAEK** *et al.* *Cell Cult. Somatic Genet. Plants*, 1989, vol. 6, 425-439 [0175]
- **VAEK** *et al.* *Nature*, 1987, vol. 327, 33-37 [0175]

ES 2 298 140 T3

- **CORNELISSEN.** *Nucleic Acids Research*, 1989, vol.17, 7203-7209 [0175]
- **PERLAK et al.** *Proc.Natl.Acad.Sci*, 1991, vol. 88, 3324-3328 [0175]
- 5 • **ARSINE et al.** *Plant Molecular Biology*, 1995, vol. 28, 513-524 [0175]
- **MURRAY et al.** *Nucleic Acids Research*, 1989, vol. 17, 477-498 [0175]
- **WOLIN; WALTER.** *Embo Journal*, 1988, vol. 7, 3559-3569 [0175]
- 10 • **KOZIEL et al.** *Bio/Technology*, 1993, vol. 11, 194-199 [0175]
- **DELLAPORTA; CALDERON-URREA.** *Science*, 1994, vol. 266, 1501-1505 [0175]
- 15 • **IRISH.** *BioEssays*, 1996, vol. 18 (5), 363-369 [0175]
- **HESLOP-HARRISON.** *Proc.Linn.Soc.*, London., 1961, vol. 172, 108-123 [0175]
- **HANSEN et al.** *Crop Science*, 1976, vol. 16, 371-374 [0175]
- 20 • **MORINO et al.** *Biol.Pharm.Bull.*, 1995, vol. 18 (12), 1770-1772 [0175]
- **ENDO; TSURUGI.** *J.Biol.Chem.*, 1987, vol. 262, 8128 [0175]
- 25 • **WALES et al.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1992, vol. 294 (1), 291-296 [0175]
- **WALES et al.** *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, vol. 266 (29), 19172-19179 [0175]
- **SARDANA et al.** *Plant Cell Reports*, 1996, vol. 15, 677-681 [0175]
- 30 • **GIBCO.** BAC-TO-BAC™ baculovirus expression systems: *Instruction Manual*, 1996, 1-33 [0175]
- **KING; POSSEE.** The baculovirus expression system: A laboratory guide. *Chapman and Hall*, 1990, 143-144
- 35 • Molecular probes product information sheet, live/dead viability/cytotoxicity kit, vol. L-3224, 1
- **GLAZE; RYE.** *Nature*, 1992, vol. 359, 859-861 [0175]
- **BELL et al.** *J. Orthopaedic Res.*, 1988, vol. 6, 467-474 [0175]
- 40 • **JOHNSON. J.** *Invertebr. Pathol.*, 1994, vol. 63, 123-129 [0175]
- **NEWTON et al.** *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 11917-11922 [0175]
- 45 • **GONATAS et al.** *Exp. Cell Res.*, 1975, vol. 94, 426-431 [0175]
- **BRADFORD.** *Annal. Biochem.*, 1976, vol. 72, 248-254 [0175]
- **VAIN et al.** *Plant Cell Rep.*, 1993, vol. 12, 84-88 [0175]
- 50 • **COOLEY et al.** *Theoret. Appl. Genet.*, 1995, vol. 90, 97-104 [0175]
- **KLEIN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1988, vol. 85, 4305-4309 [0175]
- 55 • **SUDHAKAR et al.** *Transgenic Res.*, 1998, vol. 7, 289-294 [0175]
- **SAMBROOK et al.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbour Lab. Press*, 1989 [0175]
- **KNIGHT et al.** *Mol. Microbiol.*, 1994, vol. 11, 429-436
- 60
- 65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión pesticida que comprende (i) un dominio de toxina; y (ii) un dominio de unión heterólogo capaz de unirse de manera no específica a una membrana celular sin romper la membrana.
- 10 2. Ácido nucleico según la reivindicación 1, en el que el dominio de toxina deriva de la toxina cry de *Bacillus thuringiensis*.
3. Ácido nucleico según la reivindicación 2, en el que la toxina cry de *Bacillus thuringiensis* es CryIA (b) o (c).
- 15 4. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dominio de unión se une a carbohidrato.
5. Ácido nucleico según la reivindicación 4, en el que el dominio de unión tiene afinidad de galactosa o galactosilo.
- 20 6. Ácido nucleico según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que el dominio de unión deriva de lectina.
7. Ácido nucleico según la reivindicación 6, en el que la lectina es un tipo de proteína inactivadora de ribosomas del tipo dos.
- 25 8. Ácido nucleico según la reivindicación 7, en el que el dominio de unión deriva de la cadena B de la toxina de ricina.
9. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el que el dominio de toxina comprende una secuencia de aminoácidos codificable por toda o parte de las SEC ID No: 1 (CryIA(b)) o la SEC ID No: 2 (CryIA(c)).
- 30 10. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en el que el dominio de unión comprende una secuencia de aminoácidos codificable por toda o parte de las SEC ID No: 4 (RTB2) o la SEC ID No: 5 (RTB3).
- 35 11. Ácido nucleico según la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que el polipéptido comprende la combinación CryIA-RTB que tiene una secuencia de aminoácidos codificable por cualquiera de la SEC ID No: 6 (CryIA(b)-RTB1); SEC ID No: 7 (CryIA(b)-RTB2); SEC ID No: 8 (CryIA(b)-RTB3); SEC ID No: 9 (CryIA(c)-RTB1); SEC ID No: 10 (CryIA(c)-RTB2); o SEC ID No: 11 (CryIA(c)-RTB3).
- 40 12. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, que comprende una secuencia de nucleótidos que comparte al menos un 90% de homología con cualquiera de las SEC ID Nos: 1 a 11.
- 45 13. Procedimiento de producción del ácido nucleicos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, cuyo procedimiento comprende la etapa de combinar un ácido nucleico que codifica una toxina con un ácido nucleico que codifica un dominio de unión heterólogo, donde dicho dominio de unión es capaz de unirse de manera no específica a una membrana celular sin romperla.
- 50 14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que el procedimiento comprende además la etapa de modificar la secuencia del dominio de toxina o de unión mediante la adición, inserción, delección o sustitución de uno o más nucleótidos en el ácido nucleico.
- 55 15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que la modificación de la secuencia provoca una alteración en la utilización del codón de la secuencia.
16. Vector recombinante que comprende un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 60 17. Vector según la reivindicación 16, en el que el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, está unido operativamente a un promotor.
18. Vector según la reivindicación 17, en el que el promotor es un promotor inducible que se conecta en respuesta a un elicitador u otra señal de planta que se desencadena en respuesta a la predación.
- 65 19. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, que es un vector de baculovirus o un vector adecuado para su uso en una planta.

ES 2 298 140 T3

20. Procedimiento para transformar una célula huésped, cuyo procedimiento incluye la etapa de introducir un vector según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19 en la célula y provocar o permitir la recombinación entre el vector y el genoma de la célula para introducir el ácido nucleico en el genoma.

5 21. Célula huésped que contiene el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o el vector según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19.

10 22. Célula huésped transformada con el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o el vector según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19.

23. Célula huésped según la reivindicación 21 o la reivindicación 22 que es una célula vegetal.

24. Célula huésped según la reivindicación 23, en el que la planta es una planta monocotiledónea.

15 25. Célula huésped según la reivindicación 24, en el que la monocotiledónea es maíz o arroz.

26. Proceso para producir una planta transgénica, cuyo proceso comprende las etapas de:

20 (a) realizar el procedimiento según la reivindicación 20 para producir una célula vegetal transformada.

(b) regenerar una planta a partir de dicha célula huésped transformada.

25 27. Planta obtenible mediante el proceso según la reivindicación 26, que comprende la célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25.

28. Planta que es un clon, una progenie autorreproductora o híbrida, u otro descendiente de la planta según la reivindicación 27, y que comprende la célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25.

30 29. Planta según la reivindicación 27 o la reivindicación 28, que es una monocotiledónea.

30. Planta según la reivindicación 29, en el que la monocotiledónea es maíz o arroz.

35 31. Parte o propágulo de la planta según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 30, que comprende la célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25.

32. Procedimiento para influenciar o afectar en la toxicidad de una planta a una plaga, cuyo procedimiento incluye la etapa de provocar o permitir la expresión en la planta a partir de un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

40 33. Polipéptido de fusión pesticida codificado por el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

45 34. Procedimiento para producir el polipéptido según la reivindicación 33, cuyo procedimiento comprende la etapa de provocar la expresión en una célula huésped adecuada a partir de un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

35. Composición que comprende el polipéptido según la reivindicación 33 más al menos un componente adicional.

50 36. Procedimiento para controlar plagas que comprende el uso del polipéptido según la reivindicación 33.

FIGURA 1

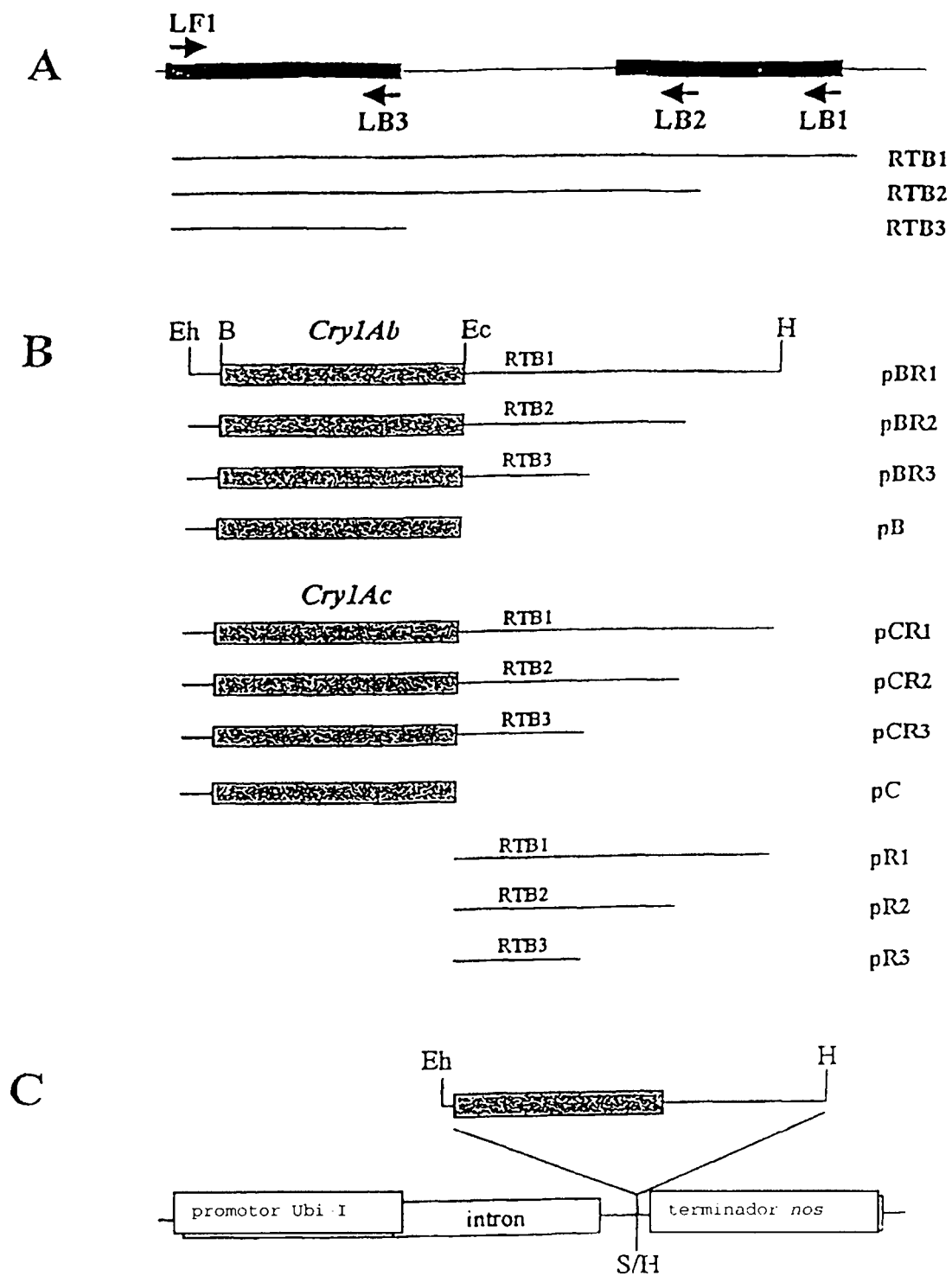


FIGURA 2

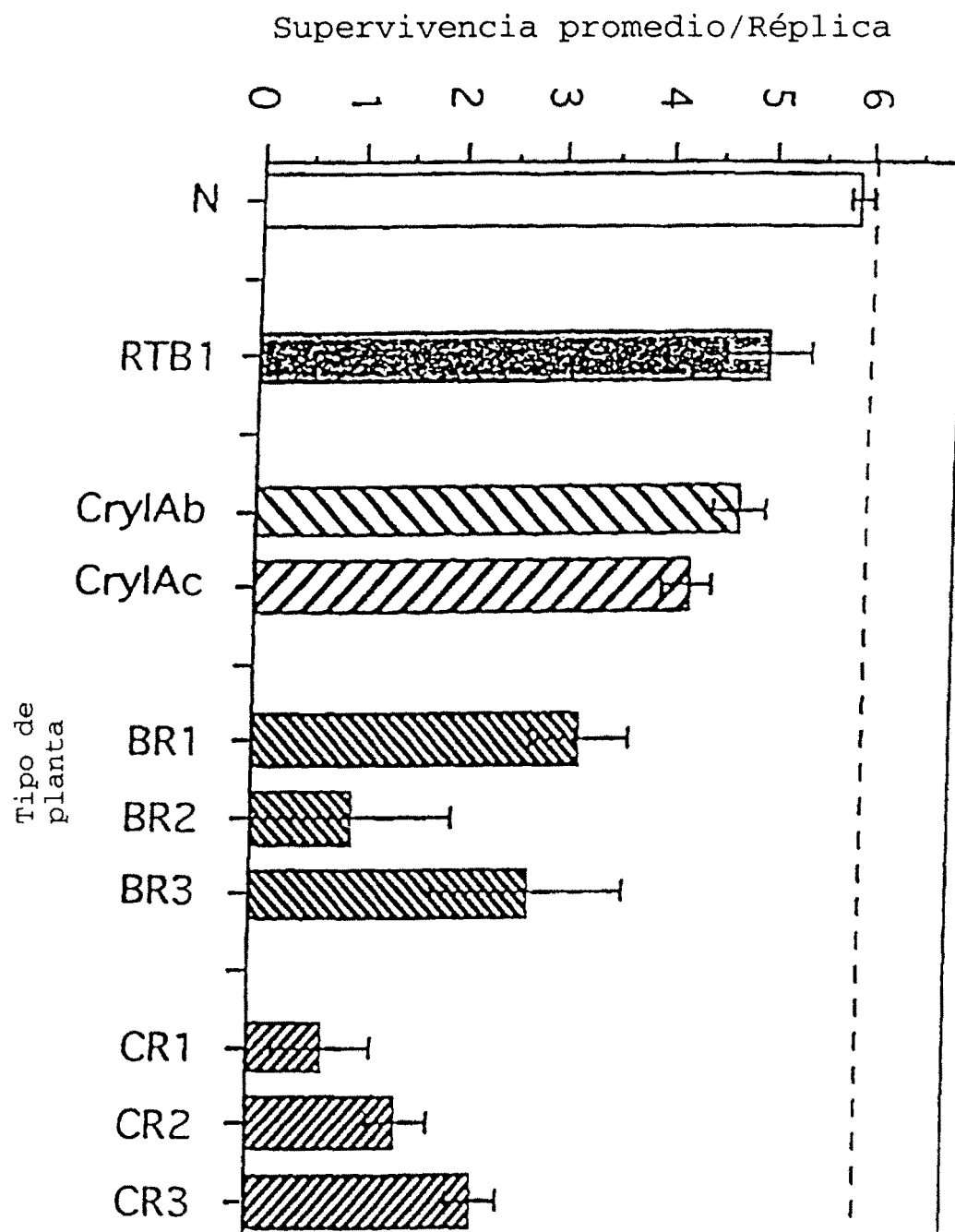


FIGURA 3a

Secuencia de nucleótidos de CryIA(b) en pFASTBAC1

```

1  AAATAAGTAT TTTACTGTTT TCGTAACAGT TTTGTAATAA AAAAACCTAT
51  AAATATTCCG GATTATTCAT ACCGTCCCAC CATCGGGCGC GGATCCATGG
101 ACAACAACCC AAACATCAAC GAATGCATTG CATACAACTG CTTGAGTAAC
151 CCAGAAGTTG AAGTACTTGG TGGAGAACGC ATTGAAACCG GTTACACTCC
201 CATCGACATC TCCTTGTCCT TGACACAGTT TCTGCTCAGC GAGTTCGTGC
251 CAGGTGCTGG GTTCGTTCTC GGACTAGTTG ACATCATCTG GGGTATCTTT
301 GGTCCATCTC AATGGGATGC ATTCTGGTGC CAAATTGAGC AGTTGATCAA
351 CCAGAGGATC GAAGAGTTCC CCAGGAACCA GGCCATCTCT AGGTTGGAAG
401 GATTGAGCAA TCTCTACCAA ATCTATGCAG AGAGCTTCAG AGAGTGGGAA
451 GCCGATCCTA CTAACCCAGC TCTCCGCGAG GAAATGCGTA TTCAATTCAA
501 CGACATGAAC AGCGCCTTGA CCACAGCTAT CCCATTGTTT GCAGTCCAGA
551 ACTACCAAGT TCCTCTCTTG TCCGTGTACG TTCAAGCAGC TAATCTTCAC
601 CTCAGCGTGC TTCGAGACGT TAGCGTGTTT GGGCAAAGGT GGGGATTGGA
651 TGCTGCAACC ATCAATAGCC GTTACAACGA CCTTACTAGG CTGATTGGAA
701 ACTACACCGA CCACGCTGTT CGTTGGTACA ACACTGGCTT GGAGCGTGTC
751 TGGGGTCCTG ATTCTAGAGA TTGGATTAGA TACAACCAGT TCAGGAGAGA
801 ATTGACCCTC ACAGTTTGGG ACATTGTGTC TCTCTTCCCG AACTATGACT
851 CCAGAACCTA CCCTATCCGT ACAGTGTCCT AACTTACCAG AGAAATCTAT
901 ACTAACCCAG TTCTTGAGAA CTCGACGGT AGCTTCCGTG GTTCTGCCCA
951 AGGTATCGAA GGCTCCATCA GGAGCCCACA CTTGATGGAC ATCTTGAACA
1001 GCATAACTAT CTACACCGAT GCTCACAGAG GAGAGTATTA CTGGTCTGGA
1051 CACCAGATCA TGGCCTCTCC AGTTGGATTG AGCGGGCCCG AGTTTACCTT
1101 TCCTCTCTAT GGAACATATG GAAACGCCGC TCCACAACAA CGTATCGTTG
1151 CTCAACTAGG TCAGGGTGTC TACAGAACCT TGTCTTCCAC CTTGTACAGA
1201 AGACCCTTCA ATATCGGTAT CAACAACCAG CAACTTTCCG TTCTTGACGG
1251 AACAGAGTTC GCCTATGGAA CCTCTTCTAA CTTGCCATCC GCTGTTTACA
1301 GAAAGAGCGG AACCCTTGAT TCCTTGGACG AAATCCCACC ACAGAACAAC
1351 AATGTGCCAC CCAGGCAAGG ATTCTCCAC AGGTTGAGCC ACGTGTCCAT
1401 GTTCCGTTCC GGATTAGCA ACAGTTCCGT GAGCATCATC AGAGCTCCTA

```

FIGURA 3a (continuación)

```

1451  TGTTCATG GATTCATCGT AGTGCTGAGT TCAACAATAT CATTCTTCC
1501  TCTCAAATCA CCCAAATCCC ATTGACCAAG TCTACTAACC TTGGATCTGG
1551  AACTTCTGTC GTGAAAGGAC CAGGCTTCAC AGGAGGTGAT ATTCTTAGAA
1601  GAACTTCTCC TGGCCAGATT AGCACCTCA GAGTTAACAT CACTGCACCA
1651  CTTTCTCAAA GATATCGTGT CAGGATTCGT TACGCATCTA CCACTAACTT
1701  GCAATTCCAC ACCTCCATCG ACGGAAGGCC TATCAATCAG GGTAACCTCT
1751  CCGCAACCAT GTCAAGCGGC AGCAACTTGC AATCCGGCAG CTTCAGAACC
1801  GTCGGTTTCA CTA CTCTCTT CAACTTCTCT AACGGATCAA GCGTTTTTCA
1851  CCTTAGCGCT CATGTGTTCA ATTCTGGCAA TGAAGTGATC ATTGACCGTA
1901  TTGAGTTTGT GCCTGCCGAA GTTACCTTCG AGGCTGAGTA CTGAGAATTC
1951  AAAGGCCTAC GTCGACGAGC TCACTAGTCG CGGCCGCTTT CGAATCTAGA
2001  GCCTGCAGTC TCGAGGCATG CGGTACCAAG CTTGTCGAGA AGTACTAGAG
2051  GATCATAATC AG

```


FIGURA 3b

Secuencia de nucleótidos de CryIA(c) en pFASTBAC1: SEC ID
No: 2

```

1  AAATAAGTAT TTTACTGTTT TCGTAACAGT TTTGTAATAA AAAAACCTAT
51  AAATATTCCG GATTATTCAT ACCGTCCCAC CATCGGGCGC GGATCCATGG
101  ACAACAACCC AAACATCAAC GAATGCATTC CATACAACTG CTTGAGTAAC
151  CCAGAAGTTG AAGTACTTGG TGGAGAACGC ATTGAAACCG GTTACACTCC
201  CATCGACATC TCCTTGTCCT TGACACAGTT TCTGCTCAGC GAGTTCGTGC
251  CAGGTGCTGG GTTCGTTCTC GGACTAGTTG ACATCATCTG GGGTATCTTT
301  GGTCCATCTC AATGGGATGC ATTCCTGGTG CAAATTGAGC AGTTGATCAA
351  CCAGAGGATC GAAGAGTTCG CCAGGAACCA GGCCATCTCT AGGTTGGAAG
401  GATTGAGCAA TCTCTACCAA ATCTATGCAG AGAGCTTCAG AGAGTGGGAA
451  GCCGATCCTA CTAACCCAGC TCTCCGCGAG GAAATGCGTA TTCAATTCAA
501  CGACATGAAC AGCGCCTTGA CCACAGCTAT CCCATTGTTT GCAGTCCAGA
551  ACTACCAAGT TCCTCTCTTG TCCGTGTACG TTCAAGCAGC TAATCTTCAC
601  CTCAGCGTGC TTCGAGACGT TAGCGTGTTT GGGCAAAGGT GGGGATTCTGA
651  TGCTGCAACC ATCAATAGCC GTTACAACGA CCTTACTAGG CTGATTGGAA
701  ACTACACCGA CCACGCTGTT CGTTGGTACA AACTGGCTT GGAGCGTGTC
751  TGGGGTCCTG ATTCTAGAGA TTGGATTAGA TACAACCAGT TCAGGAGAGA
801  ATTGACCCTC ACAGTTTGG ACATTGTGTC TCTCTCCCG AACTATGACT
851  CCAGAACCTA CCCTATCCGT ACAGTGTCCC AACTTACCAG AGAAATCTAT
901  ACTAACCAG TTCTTGAGAA CTTGACGGT AGCTTCCGTG GTTCTGCCCA
951  AGGTATCGAA GGCTCCATCA GGAGCCCACA CTTGATGGAC ATCTTGAACA
1001  GCATAACTAT CTACACCGAT GCTCACAGAG GAGAGTATTA CTGGTCTGGA
1051  CACCAGATCA TGGCCTCTCC AGTTGGATTG AGCGGGCCCG AGTTTACCTT
1101  TCCTCTCTAT GGAAGTATGG GAAACGCCGC TCCACAACAA CGTATCGTTG
1151  CTCAACTAGG TCAGGGTGTC TACAGAACCT TGTCTTCCAC CTTGTACAGA
1201  AGACCCCTCA ATATCGGTAT CAACAACCAG CAACTTTCCG TTCTTGACGG
1251  AACAGAGTTC GCCTATGGAA CCTCTTCTAA CTTGCCATCC GCTGTTTACA
1301  GAAAGAGCGG AACC GTTAT TCCTTGACG AAATCCCACC ACAGAACAAC
1351  AATGTGCCAC CCAGGCAAGG ATTCTCCAC AGGTTGAGCC ACGTGTCCAT
1401  GTTCCGTTCC GGATTACGCA ACAGTTCCGT GAGCATCATC AGAGCTCTTA

```

FIGURA 3b (continuación)

```

1451  TGTTCTCTTG GATACACCGT AGTGCTGAGT TCAACAACAT CATCGCATCC
1501  GATAGTATTA CTCAAATCCC TGCAGTGAAG GGAAACTTTC TCTTCAACGG
1551  TTCTGTCATT TCAGGACCAG GATTCACTGG TGGAGACCTC GTTAGACTCA
1601  ACAGCAGTGG AAATAACATT CAGAATAGAG GGTATATTGA AGTTCCAATT
1651  CACTTCCCAT CCACATCTAC CAGATATAGA GTTCGTGTGA GGTATGCTTC
1701  TGTGACCCCT ATTCACCTCA ACGTTAATTG GGGTAATTCA TCCATCTTCT
1751  CCAATACAGT TCCAGCTACA GCTACCTCCT TGGATAATCT CCAATCCAGC
1801  GATTTTCGGTT ACTTTGAAAG TGCCAATGCT TTTACATCTT CACTCGGTAA
1851  CATCGTGGGT GTTAGAAACT TTAGTGGGAC TGCAGGAGTG ATTATCGACA
1901  GATTCGAGTT CATTCCAGTT ACTGCAACAC TCGAGGCTGA ATGAGAATTC
1951  AAAGGCCTAC GTCGACGAGC TCACTAGTCG CGGCCGCTTT CGAATCTAGA
2001  GCCTGCAGTC TCGAGGCATG CGGTACCAAG CTTGTCGAGA AGTACTAGAG
2051  GATCATAATC AG

```

FIGURA 3c

Secuencia de nucleótidos de RTB1 en pFASTBAC1: SEC ID No:
3

```

1  AAATAAGTAT TTTACTGTTT TCGTAACAGT TTTGTAATAA AAAAACCTAT
51  AAATATTCCG GATTATTTCAT ACCGTCCCAC CATCGGGCGC GGATCCCGGT
101  CCGAAGCGCG CGGAATTTCAT GCTGATGTTT GTATGGATCC TGAGCCCATA
151  GTGCGTATCG TAGGTCGAAA TGGTCTATGT GTTGATGTTA GGGATGGAAG
201  ATTCCACAAC GGAAACGCAA TACAGTTGTG GCCATGCAAG TCTAATACAG
251  ATGCAAATCA GCTCTGGACT TTGAAAAGAG ACAATACTAT TCGATCTAAT
301  GGAAAGTGTT TAACTACTTA CGGGTACAGT CCGGGAGTCT ATGTGATGAT
351  CTATGATTGC AATACTGCTG CAACTGATGC CACCCGCTGG CAAATATGGG
401  ATAATGGAAC CATCATAAAT CCCAGATCTA GTCTAGTTTT AGCAGCGACA
451  TCAGGGAACA GTGGTACCAC ACTTACGGTG CAAACCAACA TTTATGCCGT
501  TAGTCAAGGT TGGCTTCCTA CTAATAATAC ACAACCTTTT GTTACAACCA
551  TTGTTGGGCT ATATGGTCTG TGCTTGCAAG CAAATAGTGG ACAAGTATGG
601  ATAGAGGACT GTAGCAGTGA AAAGGCTGAA CAACAGTGGG CTCTTTATGC
651  AGATGGTTCA ATACGTCCTC AGCAAACCG AGATAATTGC CTTACAAGTG
701  ATTCTAATAT ACGGGAAACA GTTGTTAAGA TCCTCTCTTG TGGCCCTGCA
751  TCCTCTGGCC AACGATGGAT GTTCAAGAAT GATGGAACCA TTTTAAATTT
801  GTATAGTGGA TTGGTGTTAG ATGTGAGGCG ATCGGATCCG AGCCTTAAAC
851  AAATCATTCT TTACCCTCTC CATGGTGACC CAAACCAAAT ATGGTTACCA
901  TTATTTTGAT AGACAGATTA CAAGCTTGTC GAGAAGTACT AGAGGATCAT
951  AATCAG

```

FIGURA 3d

Secuencia de nucleótidos de RTB2 en pFASTBAC1: SEC ID No:
4

```

1  AAATAAGTAT TTTACTGTTT TCGTAACAGT TTTGTAATAA AAAAACCTAT
51  AAATATTCCG GATTATTCAT ACCGTCCCAC CATCGGGCGC GGATCCCGGT
101  CCGAAGCGCG CGGAATTCAT GCTGATGTTT GTATGGATCC TGAGCCCATA
151  GTGCGTATCG TAGGTCGAAA TGGTCTATGT GTTGATGTTA GGGATGGAAG
201  ATTCCACAAC GGAAACGCAA TACAGTTGTG GCCATGCAAG TCTAATACAG
251  ATGCAAATCA GCTCTGGACT TTGAAAAGAG ACAATACTAT TCGATCTAAT
301  GGAAAGTGTT TAACTACTTA CGGGTACAGT CCGGGAGTCT ATGTGATGAT
351  CTATGATTGC AATACTGCTG CAACTGATGC CACCCGCTGG CAAATATGGG
401  ATAATGGAAC CATCATAAAT CCCAGATCTA GTCTAGTTTT AGCAGCGACA
451  TCAGGGAACA GTGGTACCAC ACTTACGGTG CAAACCAACA TTTATGCCGT
501  TAGTCAAGGT TGGCTTCCTA CTAATAATAC ACAACCTTTT GTTACAACCA
551  TTGTTGGGCT ATATGGTCTG TGCTTGCAAG CAAATAGTGG ACAAGTATGG
601  ATAGAGGACT GTAGCAGTGA AAAGGCTGAA CAACAGTGGG CTCTTTATGC
651  AGATGGTTCA ATACGTCCTC AGCAAAACCG AGATAATTGC CTTACAAGTG
701  ATTCTAATAT ACGGGAAACA GTTGTTAAGA TCCTCTCTTG TGGCCCTGCA
751  TCCTCTGGCC AACGATGGAT GTTCAAGAAT GATGGAACCA TTTTAAATTT
801  GTATAGTGGA TTGGTGTTAG ATGTGAAGCT TGTCGAGAAG TACTAGAGGA
851  TCATAATCAG

```

FIGURA 3e

Secuencia de nucleótidos de RTB3 en pFASTBAC1: SEC ID No:

```

1  AAATAAGTAT TTTACTGTTT TCGTAACAGT TTTGTAATAA AAAAACCTAT
51  AAATATTCCG GATTATTCAT ACCGTCCCAC CATCGGGCGC GGATCCCGGT
101  CCGAAGCGCG CGGAATTCAT GCTGATGTTT GTATGGATCC TGAGCCCATA
151  GTGCGTATCG TAGGTCGAAA TGGTCTATGT GTTGATGTTA GGGATGGAAG
201  ATTCCACAAC GGAAACGCAA TACAGTTGTG GCCATGCAAG TCTAATACAG
251  ATGCAAATCA GCTCTGGACT TTGAAAAGAG ACAATACTAT TCGATCTAAT
301  GGAAAGTGTT TAACTACTTA CGGGTACAGT CCGGGAGTCT ATGTGATGAT
351  CTATGATTGC AATACTGCTG CAACTGATGC CACCCGCTGG CAAATATGGG
401  ATAATGGAAC CATCATAAAT CCCAGATCTA GTCTAGTTTT AGCAGCGACA
451  TCAGGGAACA GTGGTACCAC ACTTACGGTG CAAACCAACA TTTATGCCGT
501  TAGTCAAGGT TGGCTTCCTA CTAATAATAC ACAACCTTTT GTTACAACCA
551  TTGTTGGGCT ATATGGTCTA AGCTTGTCGA GAAGTACTAG AGGATCATAA
601  TCAG

```

FIGURA 3f

Secuencia de nucleótidos de CryIA(b)-RTB1 en pFASTBAC1:
SEC ID No: 6

```

1  AAATAAGTAT TTTACTGTTT TCGTAACAGT TTTGTAATAA AAAAACCTAT
51  AAATATTCCG GATTATTCAT ACCGTCCCAC CATCGGGCGC GGATCCATGG
101 ACAACAACCC AAACATCAAC GAATGCATTC CATACAACTG CTTGAGTAAC
151 CCAGAAGTTG AAGTACTTGG TGGAGAACGC ATTGAAACCG GTTACACTCC
201 CATCGACATC TCCTTGTCTT TGACACAGTT TCTGCTCAGC GAGTTCGTGC
251 CAGGTGCTGG GTTCGTTCTC GGACTAGTTG ACATCATCTG GGGTATCTTT
301 GGTCCATCTC AATGGGATGC ATTCTGGTG CAAATTGAGC AGTTGATCAA
351 CCAGAGGATC GAAGAGTTCT CCAGGAACCA GGCCATCTCT AGGTTGGAAG
401 GATTGAGCAA TCTCTACCAA ATCTATGCAG AGAGCTTCAG AGAGTGGGAA
451 GCCGATCCTA CTAACCCAGC TCTCCGCGAG GAAATGCGTA TTCAATTCAA
501 CGACATGAAC AGCGCCTTGA CCACAGCTAT CCCATTGTTC GCAGTCCAGA
551 ACTACCAAGT TCCTCTCTTG TCCGTGTACG TTCAAGCAGC TAATCTTCAC
601 CTCAGCGTGC TTCGAGACGT TAGCGTGTTT GGGCAAAGGT GGGGATTCTGA
651 TGCTGCAACC ATCAATAGCC GTTACAACGA CCTTACTAGG CTGATTGGAA
701 ACTACACCGA CCACGCTGTT CGTTGGTACA ACACTGGCTT GGAGCGTGTC
751 TGGGGTCCTG ATTCTAGAGA TTGGATTAGA TACAACCAGT TCAGGAGAGA
801 ATTGACCCTC ACAGTTTGG ACATTGTGTC TCTCTTCCCG AACTATGACT
851 CCAGAACCTA CCCTATCCGT ACAGTGTCCC AACTTACCAG AGAAATCTAT
901 ACTAACCCAG TTCTTGAGAA CTTGACGGT AGCTTCCGTG GTTCTGCCCCA
951 AGGTATCGAA GGCTCCATCA GGAGCCCACA CTTGATGGAC ATCTTGAACA
1001 GCATAACTAT CTACACCGAT GCTCACAGAG GAGAGTATTA CTGGTCTGGA
1051 CACCAGATCA TGGCCTCTCC AGTTGGATTC AGCGGGCCCCG AGTTTACCTT
1101 TCCTCTCTAT GGAACATATG GAAACGCCGC TCCACAACAA CGTATCGTTG
1151 CTCAACTAGG TCAGGGTGTC TACAGAACCT TGTCTTCCAC CTTGTACAGA

```

FIGURA 3f (continuación)

```

1201 AGACCCTTCA ATATCGGTAT CAACAACCAG CAACTTTCCG TTCTTGACGG
1251 AACAGAGTTC GCCTATGGAA CCTCTTCTAA CTTGCCATCC GCTGTTTACA
1301 GAAAGAGCGG AACCGTTGAT TCCTTGGACG AAATCCCACC ACAGAACAAC
1351 AATGTGCCAC CCAGGCAAGG ATTCTCCAC AGGTTGAGCC ACGTGTCCAT
1401 GTTCCGTTCC GGATTTCAGCA ACAGTTCCGT GAGCATCATC AGAGCTCCTA
1451 TGTTCTCATG GATTCATCGT AGTGCTGAGT TCAACAATAT CATTCTTCC
1501 TCTCAAATCA CCCAAATCCC ATTGACCAAG TCTACTAACC TTGGATCTGG
1551 AACTTCTGTC GTGAAAGGAC CAGGCTTCAC AGGAGGTGAT ATTCTTAGAA
1601 GAACTTCTCC TGGCCAGATT AGCACCCCTCA GAGTTAACAT CACTGCACCA
1651 CTTTCTCAAA GATATCGTGT CAGGATTCGT TACGCATCTA CCACTAACTT
1701 GCAATTCCAC ACCTCCATCG ACGGAAGGCC TATCAATCAG GGTAACCTCT
1751 CCGCAACCAT GTCAAGCGGC AGCAACTTGC AATCCGGCAG CTTCAGAACC
1801 GTCGGTTTCA CTACTCCTTT CAACTTCTCT AACGGATCAA GCGTTTTAC
1851 CCTTAGCGCT CATGTGTTCA ATTCTGGCAA TGAAGTGAC ATTGACCGTA
1901 TTGAGTTTGT GCCTGCCGAA GTTACCTTCG AGGCTGAGTA CTGAGAATTC
1951 ATGCTGATGT TTGTATGGAT CTTGAGCCCA TAGTGCGTAT CGTAGGTCGA
2001 AATGGTCTAT GTGTTGATGT TAGGGATGGA AGATTCCACA ACGGAAACGC
2051 AATACAGTTG TGGCCATGCA AGTCTAATAC AGATGCAAAT CAGCTCTGGA
2101 CTTTGAAAAG AGACAATACT ATTCGATCTA ATGGAAAGTG TTAACTACT
2151 TACGGGTACA GTCCGGGAGT CTATGTGATG ATCTATGATT GCAATACTGC
2201 TGCAACTGAT GCCACCCGCT GGCAAATATG GGATAATGGA ACCATCATAA
2251 ATCCCAGATC TAGTCTAGTT TTAGCAGCGA CATCAGGGAA CAGTGGTACC
2301 ACACTTACGG TGCAAACCAA CATTATGCCC GTTAGTCAAG GTTGGCTTCC
2351 TACTAATAAT ACACAACCTT TTGTTACAAC CATTGTTGGG CTATATGGTC
2401 TGTGCTTGCA AGCAAATAGT GGACAAGTAT GGATAGAGGA CTGTAGCAGT
2451 GAAAAGGCTG AACAAACAGT GGCTCTTTAT GCAGATGGTT CAATACGTCC
2501 TCAGCAAAAC CGAGATAATT GCCTTACAAG TGATTCTAAT ATACGGGAAA
2551 CAGTTGTTAA GATCCTCTCT TGTGGCCCTG CATCCTCTGG CCAACGATGG
2601 ATGTTCAAGA ATGATGGAAC CATTTTAAAT TTGTATAGTG GATTGGTGTT
2651 AGATGTGAGG CGATCGGATC CGAGCCTTAA ACAAATCATT CTTTACCCTC
2701 TCCATGGTGA CCCAAACCAA ATATGGTTAC CATTATTTTG ATAGACAGAT
2751 TACAAGCTTG TCGAGAAGTA CTAGAGGATC ATAATCAG

```

FIGURA 3g

Secuencia de nucleótidos de CryIA(b)-RTB2 en pFASTBAC1:
SEC ID No: 7

```

1  AAATAAGTAT TTTACTGTTT TCGTAACAGT TTTGTAATAA AAAAACCTAT
51  AAATATTCCG GATTATTCAT ACCGTCCCAC CATCGGGCGC GGATCCATGG
101  ACAACAACCC AAACATCAAC GAATGCATTC CATACAACTG CTTGAGTAAC
151  CCAGAAGTTG AAGTACTTGG TGGAGAACGC ATTGAAACCG GTTACACTCC
201  CATCGACATC TCCTTGTCCT TGACACAGTT TCTGCTCAGC GAGTTCGTGC
251  CAGGTGCTGG GTTCGTTCTC GGACTAGTTG ACATCATCTG GGGTATCTTT
301  GGTCCATCTC AATGGGATGC ATTCCTGGTG CAAATTGAGC AGTTGATCAA
351  CCAGAGGATC GAAGAGTTCG CCAGGAACCA GGCCATCTCT AGGTTGGAAG
401  GATTGAGCAA TCTCTACCAA ATCTATGCAG AGAGCTTCAG AGAGTGGGAA
451  GCCGATCCTA CTAACCCAGC TCTCCGCGAG GAAATGCGTA TTCAATTCAA
501  CGACATGAAC AGCGCCTTGA CCACAGCTAT CCCATTGTTC GCAGTCCAGA
551  ACTACCAAGT TCCTCTCTTG TCCGTGTACG TTCAAGCAGC TAATCTTCAC
601  CTCAGCGTGC TTCGAGACGT TAGCGTGTTT GGGCAAAGGT GGGGATTCTGA
651  TGCTGCAACC ATCAATAGCC GTTACAACGA CCTTACTAGG CTGATTGGAA
701  ACTACACCGA CCACGCTGTT CGTTGGTACA ACACTGGCTT GGAGCGTGTC
751  TGGGGTCTCTG ATTCTAGAGA TTGGATTAGA TACAACCACT TCAGGAGAGA
801  ATTGACCCTC ACAGTTTTTG ACATTGTGTC TCTCTTCCCG AACTATGACT
851  CCAGAACCTA CCCTATCCGT ACAGTGTCCT AACTTACCAG AGAAATCTAT
901  ACTAACCCAG TTCTTGAGAA CTTGACGGT AGCTTCCGTG GTTCTGCCCA
951  AGGTATCGAA GGCTCCATCA GGAGCCCACA CTTGATGGAC ATCTTGAACA
1001  GCATAACTAT CTACACCGAT GCTCACAGAG GAGAGTATTA CTGGTCTGGA
1051  CACCAGATCA TGGCCTCTCC AGTTGGATTC AGCGGGCCCG AGTTTACCTT
1101  TCCTCTCTAT GGAACATATG GAAACGCCGC TCCACAACAA CGTATCGTTG
1151  CTCAACTAGG TCAGGGTGTC TACAGAACCT TGTCTTCCAC CTTGTACAGA

```


FIGURA 3g (continuación)

1201 AGACCCCTTCA ATATCGGTAT CAACAACCAG CAACTTTCCG TTCTTGACGG
 1251 AACAGAGTTC GCCTATGGAA CCTCTTCTAA CTTGCCATCC GCTGTTTACA
 1301 GAAAGAGCGG AACC GTTGAT TCCTTGACG AAATCCCACC ACAGAACAAC
 1351 AATGTGCCAC CCAGGCAAGG ATTCTCCAC AGGTTGAGCC ACGTGTCAT
 1401 GTTCCGTTCC GGATTCAGCA ACAGTTCCGT GAGCATCATC AGAGCTCCTA
 1451 TGTTCTCATG GATTCATCGT AGTGCTGAGT TCAACAATAT CATTCTTCC
 1501 TCTCAAATCA CCCAAATCCC ATTGACCAAG TCTACTAACC TTGGATCTGG
 1551 AACTTCTGTC GTGAAAGGAC CAGGCTTCAC AGGAGGTGAT ATTCTTAGAA
 1601 GAACTTCTCC TGGCCAGATT AGCACCCCTCA GAGTTAACAT CACTGCACCA
 1651 CTTTCTCAA GATATCGTGT CAGGATTCGT TACGCATCTA CCACTAACTT
 1701 GCAATTCAC ACCTCCATCG ACGGAAGGCC TATCAATCAG GGTAACCTTCT
 1751 CCGCAACCAT GTCAAGCGGC AGCAACTTGC AATCCGGCAG CTTCAGAACC
 1801 GTCGGTTTCA CTACTCCTTT CAACTTCTCT AACGGATCAA GCGTTTTTAC
 1851 CCTTAGCGCT CATGTGTTCA ATTCTGGCAA TGAAGTGATC ATTGACCGTA
 1901 TTGAGTTTGT GCCTGCCGAA GTTACCTTCG AGGCTGAGTA CTGAGAATTC
 1951 ATGCTGATGT TTGTATGGAT CCTGAGCCCA TAGTGCGTAT CGTAGGTCGA
 2001 AATGGTCTAT GTGTTGATGT TAGGGATGGA AGATTCCACA ACGGAAACGC
 2051 AATACAGTTG TGGCCATGCA AGTCTAATAC AGATGCAAAT CAGCTCTGGA
 2101 CTTTGAAAAG AGACAATACT ATTCGATCTA ATGGAAAGTG TTAACTACT
 2151 TACGGGTACA GTCCGGGAGT CTATGTGATG ATCTATGATT GCAATACTGC
 2201 TGCAACTGAT GCCACCCGCT GGCAATATG GGATAATGGA ACCATCATAA
 2251 ATCCCAGATC TAGTCTAGTT TTAGCAGCGA CATCAGGGAA CAGTGGTACC
 2301 AACTTACGG TGCAAACCAA CATTTATGCC GTTAGTCAAG GTTGGCTTCC
 2351 TACTAATAAT ACACAACCTT TTGTTACAAC CATTGTTGGG CTATATGGTC
 2401 TGTGCTTGCA AGCAAATAGT GGACAAGTAT GGATAGAGGA CTGTAGCAGT
 2451 GAAAAGGCTG AACAAACAGT GGCTCTTTAT GCAGATGGTT CAATACGTCC
 2501 TCAGCAAAAC CGAGATAATT GCCTTACAAG TGATTCTAAT ATACGGGAAA
 2551 CAGTTGTTAA GATCCTCTCT TGTGGCCCTG CATCCTCTGG CCAACGATGG
 2601 ATGTTCAAGA ATGATGGAAC CATTTTAAAT TTGTATAGTG GATTGGTGTT
 2651 AGATGTGAAG CTTGTGAGAG AGTACTAGAG GATCATAATC AG

FIGURA 3h

Secuencia de nucleótidos de CryIA(b)-RTB3 en pFASTBAC1:
SEC ID No: 8

```

1  AAATAAGTAT TTTACTGTTT TCGTAACAGT TTTGTAATAA AAAAACCTAT
51  AAATATTCCG GATTATTCAT ACCGTCCCAC CATCGGGCGC GGATCCATGG
101  ACAACAACCC AAACATCAAC GAATGCATTC CATACAACTG CTTGAGTAAC
151  CCAGAAGTTG AAGTACTTGG TGGAGAACGC ATTGAAACCG GTTACTACTCC
201  CATCGACATC TCCTTGTCTT TGACACAGTT TCTGCTCAGC GAGTTCGTGC
251  CAGGTGCTGG GTTCGTTCTC GGACTAGTTG ACATCATCTG GGGTATCTTT
301  GGTCCATCTC AATGGGATGC ATTCTGGTG CAAATTGAGC AGTTGATCAA
351  CCAGAGGATC GAAGAGTTCG CCAGGAACCA GGCCATCTCT AGGTTGGAAG
401  GATTGAGCAA TCTCTACCAA ATCTATGCAG AGAGCTTCAG AGAGTGGGAA
451  GCCGATCCTA CTAACCCAGC TCTCCGCGAG GAAATGCGTA TTCAATTCAA
501  CGACATGAAC AGCGCCTTGA CCACAGCTAT CCCATTGTTC GCAGTCCAGA
551  ACTACCAAGT TCCTCTCTTG TCCGTGTACG TTCAAGCAGC TAATCTTCAC
601  CTCAGCGTGC TTCGAGACGT TAGCGTGTTT GGGCAAAGGT GGGGATTCTGA
651  TGCTGCAACC ATCAATAGCC GTTACAACGA CCTTACTAGG CTGATTGGAA
701  ACTACACCGA CCACGCTGTT CGTTGGTACA AACTGGCTT GGAGCGTGTC
751  TGGGGTCCTG ATTCTAGAGA TTGGATTAGA TACAACCAGT TCAGGAGAGA
801  ATTGACCCTC ACAGTTTGG ACATTGTGTC TCTCTTCCCG AACTATGACT
851  CCAGAACCTA CCCTATCCGT ACAGTGTCCT AACTTACCAG AGAAATCTAT
901  ACTAACCCAG TTCTTGAGAA CTTGACGGT AGCTTCCGTG GTTCTGCCCA
951  AGGTATCGAA GGCTCCATCA GGAGCCCACA CTTGATGGAC ATCTTGAACA
1001  GCATAACTAT CTACACCGAT GCTCACAGAG GAGAGTATTA CTGGTCTGGA
1051  CACCAGATCA TGGCCTCTCC AGTTGGATTG AGCGGGCCCG AGTTTACCTT
1101  TCCTCTCTAT GGAACATG GAAACGCCGC TCCACAACAA CGTATCGTTG
1151  CTCAACTAGG TCAGGGTGTC TACAGAACCT TGTCTTCCAC CTTGTACAGA

```

FIGURA 3h (continuación)

1201 AGACCCTTCA ATATCGGTAT CAACAACCAG CAACTTTCCG TTCTTGACGG
 1251 AACAGAGTTC GCCTATGGAA CCTCTTCTAA CTTGCCATCC GCTGTTTACA
 1301 GAAAGAGCGG AACCGTTGAT TCCTTGACG AAATCCCACC ACAGAACAAC
 1351 AATGTGCCAC CCAGGCAAGG ATTCTCCAC AGGTTGAGCC ACGTGTCAT
 1401 GTTCCGTTCC GGATTGAGCA ACAGTTCCGT GAGCATCATC AGAGCTCCTA
 1451 TGTTCATG GATTCATCGT AGTGCTGAGT TCAACAATAT CATTCTTCC
 1501 TCTCAAATCA CCAAATCCC ATTGACCAAG TCTACTAACC TTGGATCTGG
 1551 AACTTCTGTC GTGAAAGGAC CAGGCTTCAC AGGAGGTGAT ATTCTTAGAA
 1601 GAACTTCTCC TGGCCAGATT AGCACCTCA GAGTTAACAT CACTGCACCA
 1651 CTTTCTCAA GATATCGTGT CAGGATTCGT TACGCATCTA CCACTAACTT
 1701 GCAATTCCAC ACCTCCATCG ACGGAAGGCC TATCAATCAG GGTAAGTTCT
 1751 CCGCAACCAT GTCAAGCGGC AGCAACTTGC AATCCGGCAG CTTCAGAACC
 1801 GTCGGTTTCA CTACTCCTTT CAACTTCTCT AACGGATCAA GCGTTTTTAC
 1851 CCTTAGCGCT CATGTGTTCA ATTCTGGCAA TGAAGTGATC ATTGACCGTA
 1901 TTGAGTTTGT GCCTGCCGAA GTTACCTTCG AGGCTGAGTA CTGAGAATTC
 1951 ATGCTGATGT TTGTATGGAT CCTGAGCCCA TAGTGCGTAT CGTAGGTCGA
 2001 AATGGTCTAT GTGTTGATGT TAGGGATGGA AGATTCCACA ACGGAAACGC
 2051 AATACAGTTG TGGCCATGCA AGTCTAATAC AGATGCAAAT CAGCTCTGGA
 2101 CTTTGAAAAG AGACAATACT ATTCGATCTA ATGGAAAGTG TTAACTACT
 2151 TACGGGTACA GTCCGGGAGT CTATGTGATG ATCTATGATT GCAATACTGC
 2201 TGCAACTGAT GCCACCCGCT GGCAAATATG GGATAATGGA ACCATCATAA
 2251 ATCCCAGATC TAGTCTAGTT TTAGCAGCGA CATCAGGGAA CAGTGGTACC
 2301 ACACTTACGG TGCAAACCAA CATTATGCC GTTAGTCAAG GTTGGCTTCC
 2351 TACTAATAAT ACACAACCTT TTGTTACAAC CATTGTTGGG CTATATGGTC
 2401 TAAGCTTGTC GAGAAGTACT AGAGGATCAT AATCAG

FIGURA 3i

Secuencia de nucleótidos de CryIA(c)-RTB1 en pFASTBAC1:
SEC ID No: 9

```

1  AAATAAGTAT TTTACTGTTT TCGTAACAGT TTTGTAATAA AAAAACCTAT
51  AAATATTCCG GATTATTCAT ACCGTCCCAC CATCGGGCGC GGATCCATGG
101  ACAACAACCC AAACATCAAC GAATGCATTG CATACAACTG CTTGAGTAAC
151  CCAGAAGTTG AAGTACTTGG TGGAGAACGC ATTGAAACCG GTTACACTCC
201  CATCGACATC TCCTTGTCTT TGACACAGTT TCTGCTCAGC GAGTTCGTGC
251  CAGGTGCTGG GTTCGTTCTC GGACTAGTTG ACATCATCTG GGGTATCTTT
301  GGTCCATCTC AATGGGATGC ATTCCTGGTG CAAATTGAGC AGTTGATCAA
351  CCAGAGGATC GAAGAGTTCG CCAGGAACCA GGCCATCTCT AGGTTGGAAG
401  GATTGAGCAA TCTCTACCAA ATCTATGCAG AGAGCTTCAG AGAGTGGGAA
451  GCCGATCCTA CTAACCCAGC TCTCCGCGAG GAAATGCGTA TTCAATTCAA
501  CGACATGAAC AGCGCCTTGA CCACAGCTAT CCCATTGTTT GCAGTCCAGA
551  ACTACCAAGT TCCTCTCTTG TCCGTGTACG TTCAAGCAGC TAATCTTCAC
601  CTCAGCGTGC TTCGAGACGT TAGCGTGTTT GGGCAAAGGT GGGGATTCTGA
651  TGCTGCAACC ATCAATAGCC GTTACAACGA CCTTACTAGG CTGATTGGAA
701  ACTACACCGA CCACGCTGTT CGTTGGTACA ACACTGGCTT GGAGCGTGTC
751  TGGGGTCCTG ATTCTAGAGA TTGGATTAGA TACAACCAGT TCAGGAGAGA
801  ATTGACCCTC ACAGTTTTGG ACATTGTGTC TCTCTTCCCG AACTATGACT
851  CCAGAACCTA CCCTATCCGT ACAGTGTCCT AACTTACCAG AGAAATCTAT
901  ACTAACCCAG TTCTTGAGAA CTTGACGCTT AGCTTCCGTG GTTCTGCCCCA
951  AGGTATCGAA GGCTCCATCA GGAGCCCACA CTTGATGGAC ATCTTGAACA
1001  GCATAACTAT CTACACCGAT GCTCACAGAG GAGAGTATTA CTGGTCTGGA
1051  CACCAGATCA TGGCCTCTCC AGTTGGATTG AGCGGGCCCG AGTTTACCTT
1101  TCCTCTCTAT GGAAGTATGG GAAACGCCGC TCCACAACAA CGTATCGTTG
1151  CTCAACTAGG TCAGGGTGTC TACAGAACCT TGTCTTCCAC CTTGTACAGA

```

FIGURA 3i (continuación)

```

1201  AGACCCTTCA ATATCGGTAT CAACAACCAG CAACTTTCCG TTCTTGACGG
1251  AACAGAGTTC GCCTATGGAA CCTCTTCTAA CTTGCCATCC GCTGTTTACA
1301  GAAAGAGCGG AACCGTTGAT TCCTTGACG AAATCCCACC ACAGAACAAC
1351  AATGTGCCAC CCAGGCAAGG ATTCTCCAC AGGTTGAGCC ACGTGTCAT
1401  GTTCCGTTCC GGATTCAGCA ACAGTTCCGT GAGCATCATC AGAGCTCCTA
1451  TGTTCTCTTG GATACACCGT AGTGCTGAGT TCAACAACAT CATCGCATCC
1501  GATAGTATTA CTCAAATCCC TGCAGTGAAG GGAAACTTTC TCTTCAACGG
1551  TTCTGTCATT TCAGGACCAG GATTCACTGG TGGAGACCTC GTTAGACTCA
1601  ACAGCAGTGG AAATAACATT CAGAATAGAG GGTATATTGA AGTTCCAATT
1651  CACTTCCCAT CCACATCTAC CAGATATAGA GTTCGTGTGA GGTATGCTTC
1701  TGTGACCCCT ATTCACCTCA ACGTTAATTG GGGTAATTCA TCCATCTTCT
1751  CCAATACAGT TCCAGCTACA GCTACCTCCT TGGATAATCT CCAATCCAGC
1801  GATTTCCGTT ACTTTGAAAG TGCCAATGCT TTTACATCTT CACTCGGTAA
1851  CATCGTGGGT GTTAGAAACT TTAGTGGGAC TGCAGGAGTG ATTATCGACA
1901  GATTCGAGTT CATTCCAGTT ACTGCAACAC TCGAGGCTGA ATGAGAATTC
1951  ATGCTGATGT TTGTATGGAT CCTGAGCCCA TAGTGCGTAT CGTAGGTCGA
2001  AATGGTCTAT GTGTTGATGT TAGGGATGGA AGATTCCACA ACGGAAAACG
2051  AATACAGTTG TGGCCATGCA AGTCTAATAC AGATGCAAAT CAGCTCTGGA
2101  CTTTGAAAAG AGACAATACT ATTCGATCTA ATGGAAAGTG TTTAACTACT
2151  TACGGGTACA GTCCGGGAGT CTATGTGATG ATCTATGATT GCAATACTGC
2201  TGCAACTGAT GCCACCGCT GGCAATATG GGATAATGGA ACCATCATAA
2251  ATCCCAGATC TAGTCTAGTT TTAGCAGCGA CATCAGGGAA CAGTGGTACC
2301  ACACCTACGG TGCAAAACCA CATTATATGCC GTTAGTCAAG GTTGGCTTCC
2351  TACTAATAAT ACACAACCTT TTGTTACAAC CATTGTTGGG CTATATGGTC
2401  TGTGCTTGCA AGCAAATAGT GGACAAGTAT GGATAGAGGA CTGTAGCAGT
2451  GAAAAGGCTG AACAAACAGT GGCTCTTTAT GCAGATGGTT CAATACGTCC
2501  TCAGCAAAAC CGAGATAATT GCCTTACAAG TGATTCTAAT ATACGGGAAA
2551  CAGTTGTTAA GATCCTCTCT TGTGGCCCTG CATCCTCTGG CCAACGATGG
2601  ATGTTCAAGA ATGATGGAAC CATTTTAAAT TTGTATAGTG GATTGGTGTT
2651  AGATGTGAGG CGATCGGATC CGAGCCTTAA ACAAATCATT CTTTACCCTC
2701  TCCATGGTGA CCCAAACCAA ATATGGTTAC CATTATTTTG ATAGACAGAT
2751  TACAAGCTTG TCGAGAAGTA CTAGAGGATC ATAATCAG

```

FIGURA 3j

Secuencia de nucleótidos de CryIA(c)-RTB2 en pFASTBAC1:
SEC ID No: 10

```

1  AAATAAGTAT TTTACTGTTT TCGTAACAGT TTTGTAATAA AAAAACCTAT
51  AAATATTCCG GATTATTCAT ACCGTCCCAC CATCGGGCGC GGATCCATGG
101  ACAACAACCC AAACATCAAC GAATGCATTC CATACAACTG CTTGAGTAAC
151  CCAGAAGTTG AAGTACTTGG TGGAGAACGC ATTGAAACCG GTTACACTCC
201  CATCGACATC TCCTTGTCCT TGACACAGTT TCTGCTCAGC GAGTTCGTGC
251  CAGGTGCTGG GTTCGTTCTC GGACTAGTTG ACATCATCTG GGGTATCTTT
301  GGTCCATCTC AATGGGATGC ATTCTGGTG CAAATTGAGC AGTTGATCAA
351  CCAGAGGATC GAAGAGTTCG CCAGGAACCA GGCCATCTCT AGGTTGGAAG
401  GATTGAGCAA TCTCTACCAA ATCTATGCAG AGAGCTTCAG AGAGTGGGAA
451  GCCGATCCTA CTAACCCAGC TCTCCGCGAG GAAATGCGTA TTCAATTCAA
501  CGACATGAAC AGCGCCTTGA CCACAGCTAT CCCATTGTTC GCAGTCCAGA
551  ACTACCAAGT TCCTCTCTTG TCCGTGTACG TTCAAGCAGC TAATCTTCAC
601  CTCAGCGTGC TTCGAGACGT TAGCGTGTTT GGGCAAAGGT GGGGATTCGA
651  TGCTGCAACC ATCAATAGCC GTTACAACGA CCTTACTAGG CTGATTGGAA
701  ACTACACCGA CCACGCTGTT CGTTGGTACA ACACTGGCTT GGAGCGTGTC
751  TGGGGTCCTG ATTCTAGAGA TTGGATTAGA TACAACCAGT TCAGGAGAGA
801  ATTGACCCTC ACAGTTTTGG ACATTGTGTC TCTCTTCCCG AACTATGACT
851  CCAGAACCTA CCCTATCCGT ACAGTGTCCT AACTTACCAG AGAAATCTAT
901  ACTAACCAG TTCTTGAGAA CTTGACGGT AGCTTCCGTG GTTCTGCCCA
951  AGGTATCGAA GGCTCCATCA GGAGCCCACA CTTGATGGAC ATCTTGAACA
1001  GCATAACTAT CTACACCGAT GCTCACAGAG GAGAGTATTA CTGGTCTGGA
1051  CACCAGATCA TGGCCTCTCC AGTTGGATTG AGCGGGCCCG AGTTTACCTT
1101  TCCTCTCTAT GGAACATGG GAAACGCCGC TCCACAACAA CGTATCGTTG
1151  CTCAACTAGG TCAGGGTGTC TACAGAACCT TGTCTCCAC CTTGTACAGA

```

FIGURA 3j (continuación)

```

1201 AGACCCTTCA ATATCGGTAT CAACAACCAG CAACTTTCCG TTCTTGACGG
1251 AACAGAGTTC GCCTATGGAA CCTCTTCTAA CTTGCCATCC GCTGTTTACA
1301 GAAAGAGCGG AACCGTTGAT TCCTTGACG AAATCCCACC ACAGAACAAC
1351 AATGTGCCAC CCAGGCAAGG ATTCTCCCAC AGGTTGAGCC ACGTGTCCAT
1401 GTTCCGTTCC GGATTCAGCA ACAGTTCCGT GAGCATCATC AGAGCTCCTA
1451 TGTTCTCTTG GATACACCGT AGTGCTGAGT TCAACAACAT CATCGCATCC
1501 GATAGTATTA CTCAAATCCC TGCAGTGAAG GGAAACTTTC TCTTCAACGG
1551 TTCTGTCATT TCAGGACCAG GATTCACTGG TGGAGACCTC GTTAGACTCA
1601 ACAGCAGTGG AAATAACATT CAGAATAGAG GGTATATTGA AGTTCCAATT
1651 CACTTCCCAT CCACATCTAC CAGATATAGA GTTCGTGTGA GGTATGCTTC
1701 TGTGACCCCT ATTCACCTCA ACGTTAATTG GGGTAATTCA TCCATCTTCT
1751 CCAATACAGT TCCAGCTACA GCTACCTCCT TGGATAATCT CCAATCCAGC
1801 GATTTTCGGT ACTTTGAAAG TGCCAATGCT TTTACATCTT CACTCGGTAA
1851 CATCGTGGGT GTTAGAAACT TTAGTGGGAC TGCAGGAGTG ATTATCGACA
1901 GATTCGAGTT CATTCAGTT ACTGCAACAC TCGAGGCTGA ATGAGAATTG
1951 ATGCTGATGT TTGTATGGAT CCTGAGCCCA TAGTGCGTAT CGTAGGTGCA
2001 AATGGTCTAT GTGTTGATGT TAGGGATGGA AGATTCCACA ACGGAAACGC
2051 AATACAGTTG TGGCCATGCA AGTCTAATAC AGATGCAAAT CAGCTCTGGA
2101 CTTTGAAAAG AGACAATACT ATTCGATCTA ATGGAAAAGTG TTTAACTACT
2151 TACGGGTACA GTCCGGGAGT CTATGTGATG ATCTATGATT GCAATACTGC
2201 TGCAACTGAT GCCACCCGCT GGCAAATATG GGATAATGGA ACCATCATAA
2251 ATCCCAGATC TAGTCTAGTT TTAGCAGCGA CATCAGGGAA CAGTGGTACC
2301 ACACTTACGG TGCAAAACCA CATTATGCC GTTAGTCAAG GTTGGCTTCC
2351 TACTAATAAT ACACAACCTT TTGTTACAAC CATTGTTGGG CTATATGGTC
2401 TGTGCTTGCA AGCAAATAGT GGACAAGTAT GGATAGAGGA CTGTAGCAGT
2451 GAAAAGGCTG AACAAACAGT GGCTCTTTAT GCAGATGGTT CAATACGTCC
2501 TCAGCAAAAC CGAGATAATT GCCTTACAAG TGATTCTAAT ATACGGGAAA
2551 CAGTTGTTAA GATCCTCTCT TGTGGCCCTG CATCCTCTGG CCAACGATGG
2601 ATGTTCAAGA ATGATGGAAC CATTTTAAAT TTGTATAGTG GATTGGTGTT
2651 AGATGTGAAG CTTGTGAGA AGTACTAGAG GATCATAATC AG

```

FIGURA 3k

Secuencia de nucleótidos de CryIA(c)-RTB3 en pFASTBAC1:
SEC ID No: 11

```

1  AAATAAGTAT TTTACTGTTT TCGTAACAGT TTTGTAATAA AAAAACCTAT
51  AAATATTCCG GATTATTCAT ACCGTCCCAC CATCGGGCGC GGATCCATGG
101  ACAACAACCC AAACATCAAC GAATGCATTG CATACAACCTG CTTGAGTAAC
151  CCAGAAGTTG AAGTACTTGG TGGAGAACGC ATTGAAACCG GTTACTACTCC
201  CATCGACATC TCCTTGTCCT TGACACAGTT TCTGCTCAGC GAGTTCGTGC
251  CAGGTGCTGG GTTCGTTCTC GGACTAGTTG ACATCATCTG GGGTATCTTT
301  GGTCCATCTC AATGGGATGC ATTCCTGGTG CAAATTGAGC AGTTGATCAA
351  CCAGAGGATC GAAGAGTTCTG CCAGGAACCA GGCCATCTCT AGGTTGGAAG
401  GATTGAGCAA TCTCTACCAA ATCTATGCAG AGAGCTTCAG AGAGTGGGAA
451  GCCGATCCTA CTAACCCAGC TCTCCGCGAG GAAATGCGTA TTCAATTCAA
501  CGACATGAAC AGCGCCTTGA CCACAGCTAT CCCATTGTTT GCAGTCCAGA
551  ACTACCAAGT TCCTCTCTTG TCCGTGTACG TTCAAGCAGC TAATCTTCAC
601  CTCAGCGTGC TTCGAGACGT TAGCGTGTTT GGGCAAAGGT GGGGATTCTGA
651  TGCTGCAACC ATCAATAGCC GTTACAACGA CCTTACTAGG CTGATTGGAA
701  ACTACACCGA CCACGCTGTT CGTTGGTACA AACTGGCTT GGAGCGTGTC
751  TGGGGTCCTG ATTCTAGAGA TTGGATTAGA TACAACCAGT TCAGGAGAGA
801  ATTGACCCTC ACAGTTTTGG ACATTGTGTC TCTCTTCCCG AACTATGACT
851  CCAGAACCTA CCCTATCCGT ACAGTGTCCC AACTTACCAG AGAAATCTAT
901  ACTAACCCAG TTCTTGAGAA CTTGACGGT AGCTTCCGTG GTTCTGCCCA
951  AGGTATCGAA GGCTCCATCA GGAGCCCACA CTTGATGGAC ATCTTGAACA
1001  GCATAACTAT CTACACCGAT GTCACAGAG GAGAGTATTA CTGGTCTGGA
1051  CACCAGATCA TGGCCTCTCC AGTTGGATTG AGCGGGCCCG AGTTTACCTT
1101  TCCTCTCTAT GGAACATATG GAAACGCCGC TCCACAACAA CGTATCGTTG
1151  CTCAACTAGG TCAGGGTGTC TACAGAACCT TGTCTTCCAC CTTGTACAGA

```


FIGURA 3k (continuación)

1201 AGACCCTTCA ATATCGGTAT CAACAACCAG CAACTTTCCG TTCTTGACGG
 1251 AACAGAGTTC GCCTATGGAA CCTCTTCTAA CTTGCCATCC GCTGTTTACA
 1301 GAAAGAGCGG AACCGTTGAT TCCTTGACG AAATCCCACC ACAGAACAAAC
 1351 AATGTGCCAC CCAGGCAAGG ATTCTCCAC AGGTTGAGCC ACGTGTCCAT
 1401 GTTCCGTTCC GGATTCAGCA ACAGTTCCGT GAGCATCATC AGAGCTCCTA
 1451 TGTTCCTTG GATACACCGT AGTGCTGAGT TCAACAACAT CATCGCATCC
 1501 GATAGTATTA CTCAAATCCC TGCAGTGAAG GGAACTTTC TCTTCAACGG
 1551 TTCTGTCATT TCAGGACCAG GATTCACTGG TGGAGACCTC GTTAGACTCA
 1601 ACAGCAGTGG AAATAACATT CAGAATAGAG GGTATATTGA AGTTCCAATT
 1651 CACTTCCCAT CCACATCTAC CAGATATAGA GTTCGTGTGA GGTATGCTTC
 1701 TGTGACCCCT ATTCACCTCA ACGTTAATTG GGGTAATTCA TCCATCTTCT
 1751 CCAATACAGT TCCAGCTACA GCTACCTCCT TGGATAATCT CCAATCCAGC
 1801 GATTTTCGGTT ACTTTGAAAG TGCCAATGCT TTTACATCTT CACTCGGTAA
 1851 CATCGTGGGT GTTAGAAACT TTAGTGGGAC TGCAGGAGTG ATTATCGACA
 1901 GATTCGAGTT CATTCCAGTT ACTGCAACAC TCGAGGCTGA ATGAGAATTC
 1951 ATGCTGATGT TTGTATGGAT CCTGAGCCCA TAGTGCGTAT CGTAGGTCGA
 2001 AATGGTCTAT GTGTTGATGT TAGGGATGGA AGATTCCACA ACGGAAACGC
 2051 AATACAGTTG TGGCCATGCA AGTCTAATAC AGATGCAAAT CAGCTCTGGA
 2101 CTTTGAAAAG AGACAATACT ATTCGATCTA ATGGAAAGTG TTAACTACT
 2151 TACGGGTACA GTCCGGGAGT CTATGTGATG ATCTATGATT GCAATACTGC
 2201 TGCAACTGAT GCCACCCGCT GGCAAATATG GGATAATGGA ACCATCATAA
 2251 ATCCCAGATC TAGTCTAGTT TTAGCAGCGA CATCAGGGAA CAGTGGTACC
 2301 AACTTACGG TGCAAACCAA CATTTATGCC GTTAGTCAAG GTTGGCTTCC
 2351 TACTAATAAT ACACAACCTT TTGTTACAAC CATTGTTGGG CTATATGGTC
 2401 TAAGCTTGTC GAGAAGTACT AGAGGATCAT AATCAG

ES 2 298 140 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Plant Bioscience Limited
Christou, Paul
5 Mehlo, Luke

<120> Fusiones Pesticidas

10 <130> SMK/LP5848023

<140> PCT/GB00/01633
<141> 2000-04-17

15 <150> GB 9909796.6
<151> 1999-04-28

20 <160> 19

<170> PatentIn Ver. 2.1

25 <210> 1
<211> 2062
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de nucleótidos de CryIA (b) en pFASTBAC1

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 298 140 T3

<400> 1

```

5      aaataagtat tttactgttt tcgtaacagt tttgtaataa aaaaacctat aaatattccg 60
      gattattcat accgtcccac catcgggcgc ggatccatgg acaacaaccc aaacatcaac 120
      gaatgcattc catacaactg cttgagtaac ccagaagttg aagtacttgg tggagaacgc 180
      attgaaaccg gttacactcc catcgacatc tccttgtcct tgacacagtt tctgctcagc 240
10     gagttcgtgc cagggtgctgg gttcgttctc ggactagtgtg acatcatctg ggggtatcttt 300
      ggtccatctc aatgggatgc attcctgggtg caaattgagc agttgatcaa ccagaggatc 360
      gaagagttcg ccaggaacca ggccatctct aggttggaag gattgagcaa tctctacca 420
15     atctatgcag agagcttcag agagtgggaa gccgatccta ctaaccagc tctccgcgag 480
      gaaatgcgta ttcaattcaa cgacatgaac agcgccttga ccacagctat cccattgttc 540
      gcagtccaga actaccaagt tcctctcttg tccgtgtacg ttcaagcagc taatcttcac 600
      ctacgcgtgc ttcgagacgt tagcgtgttt gggcaaaggt ggggattcga tgcgtcaacc 660
20     atcaatagcc gttacaacga ccttactagg ctgattggaa actacaccga ccacgctgtt 720
      cgttgggtaca aacttggtt ggagcgtgtc tggggtcctg attctagaga ttggattaga 780
      tacaaccagt tcaggagaga attgaccctc acagttttgg acattgtgtc tctcttccc 840

25     aactatgact ccagaaccta cctatccgt acagtgtccc aacttaccag agaaatctat 900
      actaaccag ttcttgagaa cttcgacggt agcttccgtg gttctgcca aggtatcgaa 960
      ggctccatca ggagcccaca cttgatggac atcttgaaca gcataactat ctacaccgat 1020
30     gctcacagag gagagtatta ctgggtctga caccagatca tggcctctcc agttggattc 1080
      agcggggccc agtttacctt tcctctctat ggaactatgg gaaacgccgc tccacaacaa 1140
      cgtatcgttg ctcaactagg tcagggtgtc tacagaacct tgtcttccac cttgtacaga 1200
35     agacccttca atatcgggat caacaaccag caactttccg ttcttgacgg aacagagttc 1260
      gcctatggaa cctcttctaa cttgccatcc gctgtttaca gaaagagcgg aaccgttgat 1320
      tccttgacg aaatcccacc acagaacaac aatgtgccac ccaggcaagg attctcccac 1380
      aggttgagcc acgtgtccat gttccgttcc ggattcagca acagttccgt gagcatcatc 1440
40     agagctccta tgttctcatg gattcatcgt agtctgagt tcaacaatat cattccttcc 1500
      tctcaaata cccaaatccc attgaccaag tctactaacc ttggatctgg aacttctgtc 1560
      gtgaaaggac caggcttcac aggaggtgat attcttagaa gaacttctcc tggccagatt 1620
45     agcaccctca gagttaacat cactgcacca ctttctcaaa gatatcgtgt caggattcgt 1680
      tacgcatcta ccactaactt gcaattccac acctccatcg acggaaggcc tatcaatcag 1740
      ggtaacttct ccgcaaccat gtcaagcggc agcaacttgc aatccggcag cttcagaacc 1800
      gtcggtttca ctactcctt caacttctct aacggatcaa gcgttttcac ccttagcgct 1860
50     catgtgttca attctggcaa tgaagtgtac attgaccgta ttgagtttgt gcctgccgaa 1920
      gttaccttcg aggtgagta ctgagaattc aaaggcctac gtcgacgagc tctactagtcg 1980
      cggccgctt cgaatctaga gcctgcagtc tcgaggcatg cggtagcaag cttgtcgaga 2040
55     agtactagag gatcataatc ag                                     2062

```

<210> 2

<211> 2062

60 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

65 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de nucleótidos de CryIA (c) en pFASTBAC1

ES 2 298 140 T3

<400> 2

```

5      aaataagtat tttactgttt tcgtaacagt tttgtaataa aaaaacctat aaatattccg 60
      gattattcat accgtcccac catcgggagc ggatccatgg acaacaaccc aaacatcaac 120
      gaatgcattc catacaactg cttgagtaac ccagaagttg aagtacttgg tggagaacgc 180
      attgaaaccg gttacactec catcgacatc tccttgtcct tgacacagtt tctgctcagc 240
10     gagttcgtgc caggtgctgg gttcgttctc ggactagttg acatcatctg gggatatctt 300
      ggtccatctc aatgggatgc attcctggtg caaattgagc agttgatcaa ccagaggatc 360
      gaagagttcg ccaggaacca ggccatctct aggttggaag gattgagcaa tctctacca 420
      atctatgcag agagcttcag agagtgggaa gccgatccta ctaaccagc tctccgcgag 480
15     gaaatgcgta ttcaattcaa cgacatgaac agcgccctga ccacagctat cccattgttc 540
      gcagtccaga actaccaagt tcctctcttg tccgtgtacg ttcaagcagc taatcttcac 600
      ctacgcgtgc ttcgagacgt tagcgtgttt gggcaaagg ggggattcga tgctgcaacc 660
20     atcaatagcc gttacaacga ccttactagg ctgattggaa actacaccga ccacgctgtt 720

      cgttggtaca acactggctt ggagcgtgtc tggggtcctg attctagaga ttggattaga 780
25     tacaaccagt tcaggagaga attgaccctc acagttttgg acattgtgtc tctcttcccg 840
      aactatgact ccagaacctc cctatccgt acagtgtccc aacttaccag agaaatctat 900
      actaaccag ttcttgagaa cttcgacggt agcttccgtg gttctgcca aggtatcgaa 960
30     ggctccatca ggagcccaca cttgatggac atcttgaaca gcataactat ctacaccgat 1020
      gctcacagag gagagtatta ctggtctgga caccagatca tggcctctcc agttggattc 1080
      agcgggcccc agtttacctt tcctctctat ggaactatgg gaaacgcgc tccacaacaa 1140
      cgtatcgttg ctcaactagg tcagggtgtc tacagaacct tgtcttcac cttgtacaga 1200
35     agacccttca atatcggtat caacaaccag caactttccg ttcttgacgg aacagagttc 1260
      gcctatggaa cctcttctaa cttgccatcc gctgtttaca gaaagagcgg aaccgttgat 1320
      tccttggacg aaatcccacc acagaacaac aatgtgccac ccaggcaagg attctcccac 1380
      aggttgagcc acgtgtccat gttccgttcc ggattcagca acagttccgt gagcatcatc 1440
40     agagctccta tgttctcttg gatacaccgt agtgctgagt tcaacaacat catcgcatcc 1500
      gatagtatta ctcaaactcc tgcagtgaag ggaaactttc tcttcaacgg ttctgtcatt 1560
      tcaggaccag gattcactgg tggagacctc gttagactca acagcagtgg aaataacatt 1620
45     cagaatagag ggtatattga agttccaatt cacttcccat ccacatctac cagatataga 1680
      gttcgtgtga ggtatgcttc tgtgacctc attcacctca acgttaattg gggtaattca 1740
      tccatcttct ccaatacagt tccagctaca gctacctcct tggataatct ccaatccagc 1800
      gatttcgggt actttgaaag tgccaatgct ttacatctt cactcggtaa catcgtgggt 1860
50     gttagaaact ttagtgggac tgcaggagtg attatcgaca gattcgagtt cattccagtt 1920
      actgcaacac tcgaggctga atgagaattc aaaggcctac gtcgacgagc tcactagtcg 1980
      cggccgcttt cgaatctaga gcctgcagtc tcgaggcatg cggtagcaag cttgtcgaga 2040
55     agtactagag gatcataatc ag
                                     2062

```

<210> 3

<211> 956

60 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

65 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de nucleótidos de RTB1 en pFASTBAC1

ES 2 298 140 T3

<400> 3

```

5      aaataagtat tttactgttt tcgtaacagt tttgtaataa aaaaacctat aaatattccg 60
      gattattcat accgtcccac catcgggcgc ggatcccggt ccgaagcgcg cggaattcat 120
      gctgatgttt gtatggatcc tgagcccata gtgcgatcg taggtcgaaa tgggtctatgt 180
      gttgatgtta gggatggaag attccacaac ggaaacgcaa tacagttgtg gccatgcaag 240
      tctaatacag atgcaaatca gctctggact ttgaaaagag acaatactat tcgatctaata 300
10     ggaaagtgtt taactactta cgggtacagt cggggagtct atgtgatgat ctatgattgc 360
      aatactgctg caactgatgc caccgcgtgg caaatatggg ataatggaac catcataaat 420
      cccagatcta gtctagtttt agcagcgaca tcaggaaca gtggtaccac acttacggtg 480
      caaaccaaca tttatgccgt tagtcaaggt tggcttccta ctaataatac acaacctttt 540
15     gttacaacca ttgttgggct atatggtctg tgcttgcaag caaatagtgg acaagtatgg 600

      atagaggact gtagcagtga aaaggctgaa caacagtggg ctctttatgc agatgggttca 660
20     atacgtcctc agcaaaaccg agataattgc cttacaagtg attctaatat acgggaaaca 720
      gttgtcaaga tcctctcttg tggccctgca tcctctggcc aacgatggat gttcaagaat 780
      gatggaacca ttttaaattt gtatagtggg ttggtgttag atgtgagggc atcgatcccg 840
25     agccttaaac aaatcattct ttaccctctc catggtgacc caaaccaaat atgggtacca 900
      ttattttgat agacagatta caagcttgtc gagaagtact agaggatcat aatcag      956

```

<210> 4

<211> 860

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de nucleótidos de RTB2 en pFASTBAC1

<400> 4

```

40     aaataagtat tttactgttt tcgtaacagt tttgtaataa aaaaacctat aaatattccg 60
      gattattcat accgtcccac catcgggcgc ggatcccggt ccgaagcgcg cggaattcat 120
      gctgatgttt gtatggatcc tgagcccata gtgcgatcg taggtcgaaa tgggtctatgt 180
45     gttgatgtta gggatggaag attccacaac ggaaacgcaa tacagttgtg gccatgcaag 240
      tctaatacag atgcaaatca gctctggact ttgaaaagag acaatactat tcgatctaata 300
      ggaaagtgtt taactactta cgggtacagt cggggagtct atgtgatgat ctatgattgc 360
      aatactgctg caactgatgc caccgcgtgg caaatatggg ataatggaac catcataaat 420
50     cccagatcta gtctagtttt agcagcgaca tcaggaaca gtggtaccac acttacggtg 480
      caaaccaaca tttatgccgt tagtcaaggt tggcttccta ctaataatac acaacctttt 540
      gttacaacca ttgttgggct atatggtctg tgcttgcaag caaatagtgg acaagtatgg 600
55     atagaggact gtagcagtga aaaggctgaa caacagtggg ctctttatgc agatgggttca 660
      atacgtcctc agcaaaaccg agataattgc cttacaagtg attctaatat acgggaaaca 720
      gttgtcaaga tcctctcttg tggccctgca tcctctggcc aacgatggat gttcaagaat 780
60     gatggaacca ttttaaattt gtatagtggg ttggtgttag atgtgaagct tgctcgagaag 840
      tactagagga tcataatcag                                     860

```

<210> 5

<211> 604

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 298 140 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de nucleótidos de RTB3 en pFASTBAC1

5 <400> 5

```

10      aaataagtat tttactgttt tcgtaacagt tttgtaataa aaaaacctat aaatattccg 60
      gattattcat accgtcccac catcgggcgc ggatcccggc ccgaagcgcg cggaattcat 120
      gctgatgttt gtatggatcc tgagcccata gtgcgtatcg taggtcgaaa tggctctatgt 180
      gttgatgtta gggatggaag attccacaac ggaaacgcaa tacagttgtg gccatgcaag 240
      tctaatacag atgcaaatca gctctggact ttgaaaagag acaatactat tcgatctaatt 300
15      ggaaagtgtt taactactta cgggtacagt ccgggagtcct atgtgatgat ctatgattgc 360
      aatactgctg caactgatgc caccgcctgg caaatatggg ataatggaac catcataaat 420
      cccagatcta gtctagtttt agcagcgaca tcagggaaca gtggtaccac acttacgggtg 480
      caaaccaaca tttatgccgt tagtcaaggt tggcttcccta ctaataatac acaacctttt 540
20      gttacaacca ttgttgggct atatggtcta agcttgtcga gaagtactag aggatcataa 600
      tcag                                         604

```

25 <210> 6

<211> 2788

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de nucleótidos de CryIA(b)-RTB1 en pFASTBAC1

35 <400> 6

```

40      aaataagtat tttactgttt tcgtaacagt tttgtaataa aaaaacctat aaatattccg 60
      gattattcat accgtcccac catcgggcgc ggatccatgg acaacaaccc aaacatcaac 120
      gaatgcattc catacaactg cttgagtaac ccagaagttg aagtacttgg tggagaacgc 180
      attgaaaccg gttacactcc catcgacatc tccttgtcct tgacacagtt tctgtctcagc 240
      gagttcgtgc caggtgctgg gttcgttctc ggactagttg acatcatctg gggtatcttt 300
45      ggtccatctc aatgggatgc attcctggtg caaattgagc agttgatcaa ccagaggatc 360
      gaagagttcg ccaggaacca ggccatctct aggttgggaag gattgagcaa tctctaccaa 420
      atctatgcag agagcttcag agagtgggaa gccgatccta ctaaccacgc tctccgcgag 480
      gaaatgcgta ttcaattcaa cgacatgaac agcgccttga ccacagctat cccattgttc 540
50      gcagtccaga actaccaagt tcctctcttg tccgtgtacg ttcaagcagc taatcttcac 600
      ctcagcgtgc ttcgagacgt tagcgtgttt gggcaaaggt ggggattcga tgctgcaacc 660
55      atcaatagcc gttacaacga cttactagg ctgattggaa actacaccga ccacgctggt 720

```

60

65

ES 2 298 140 T3

```

cgttggtaca acactggcctt ggagcgtgtc tggggctctg attctagaga ttggattaga 780
tacaaccagt tcaggagaga attgaccctc acagtttttg acattgtgtc tctcttcccg 840
aactatgact ccagaaccta ccttatccgt acagtgtccc aacttaccag agaaatctat 900
5 actaaccagag ttcttgagaa cttcgacggt agcttccgtg gttctgccc aaggatcgaa 960
ggctccatca ggagcccaca cttgatggac atcttgaaca gcataactat ctacaccgat 1020
gctcacagag gagagtatta ctggtctgga caccagatca tggcctctcc agttggattc 1080
10 agcggggcccg agtttacctt tctctctctat ggaactatgg gaaacgccgc tccacaacaa 1140
cgtatcgttg ctcaactagg tcagggtgtc tacagaacct tgtcttccac cttgtacaga 1200
agacccttca atatcggtat caacaaccag caactttccg ttcttgacgg aacagagttc 1260
15 gcctatggaa cctcttctaa cttgccatcc gctgtttaca gaaagagcgg aaccgttgat 1320
tcttgagcgg aaatcccacc acagaacaac aatgtgccac ccaggcaagg attctcccac 1380
aggttgagcc acgtgtccat gttccgttcc ggattcagca acagttccgt gagcatcatc 1440
agagctccta tgttctcatg gattcatcgt agtgctgagt tcaacaatat cattccttcc 1500
20 tctcaaatca cccaaatccc attgaccaag tctactaacc ttggatctgg aacttctgtc 1560
gtgaaaggac caggcttcac aggaggtgat attcttagaa gaacttctcc tggccagatt 1620
agcaccctca gagttaacat cactgcacca ctttctcaaa gatatcgtgt caggattcgt 1680
tacgcattct cactaactt gcaattccac acctccatcg acggaaggcc tatcaatcag 1740
25 ggtaacttct ccgcaaccat gtcaagcggc agcaacttgc aatccggcag cttcagaacc 1800
gtcggtttca ctactcctt caacttctct aacggatcaa gcgttttcac ctttagcgtc 1860
catgtgttca attctggcaa tgaagtgtac attgaccgta ttgagtttgt gcctgccgaa 1920
30 gttaccttcg aggctgagta ctgagaattc atgctgatgt ttgtatggat cctgagccca 1980
tagtgcgatc cgtaggtcga aatggtctat gtgttgatgt tagggatgga agattccaca 2040
acggaaacgc aatacagttg tggccatgca agtctaatac agatgcaaat cagctctgga 2100
ctttgaaaag agacaatact attcgatcta atggaaagtg tttaactact tacgggtaca 2160
35 gtccgggagt ctatgtgatg atctatgatt gcaatactgc tgcaactgat gccacccgct 2220
ggcaaatatg ggataatgga accatcataa atcccagatc tagtctagtt ttagcagcga 2280
catcagggaa cagtggatcc acacttacgg tgcaaaccaa catttatgcc gttagtcaag 2340
40 gttggcttcc tactaataat acacaacctt ttgttacaac cattgttggg ctatatggtc 2400
tgtgcttgca agcaaatagt ggacaagtat ggatagagga ctgtagcagt gaaaaggctg 2460
aacaacagtg ggctctttat gcagatggtt caatacgtcc tcagcaaaac cgagataatt 2520
gccttacaag tgattctaata atacgggaaa cagttgttaa gatcctctct tgtggccctg 2580
45 catcctctgg ccaacgatgg atgttcaaga atgatggaac cattttaaat ttgtatagtg 2640
gattggtgtt agatgtgagg cgatcgatc cgagccttaa acaaatcatt ctttaccctc 2700
tccatggtga cccaaaccaa atatggttac cattattttg atagacagat tacaagcttg 2760
50 tcgagaagta ctagaggatc ataatacag 2788

```

<210> 7

<211> 2692

55 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

60 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de nucleótidos de CryIA(b)-RTB2 en pFASTBAC1

65

ES 2 298 140 T3

<400> 7

```

aaataagtat tttactgttt tcgtaacagt tttgtaataa aaaaacctat aaatattccg 60
gattattcat accgtcccac catcgggcgc ggatccatgg acaacaaccc aaacatcaac 120
5 gaatgcattc catacaactg cttgagtaac ccagaagttg aagtacttgg tggagaacgc 180
attgaaaccg gttacactcc catcgacatc tccttgtcct tgacacagtt tctgctcagc 240
gagttcgtgc caggtgctgg gttcgttctc ggactagtgt acatcatctg gggatatctt 300
10 ggtccatctc aatgggatgc attcctgggtg caaattgagc agttgatcaa ccagaggatc 360
gaagagtctg ccaggaacca ggccatctct aggttggaag gattgagcaa tctctaccaa 420
atctatgcag agagcttcag agagtgggaa gccgatccta ctaaccagc tctccgcgag 480
gaaatgcgta ttcaattcaa cgacatgaac agcgccttga ccacagctat cccattgttc 540
15 gcagtccaga actaccaagt tcctctcttg tccgtgtacg ttcaagcagc taatcttcac 600
ctcagcgtgc ttcgagacgt tagcgtgttt gggcaaagggt ggggattcga tgctgcaacc 660
atcaatagcc gttacaacga cttactagg ctgattggaa actacaccga ccacgctgtt 720
cgttggtaca aactggctt ggagcgtgtc tggggtcctg attctagaga ttggattaga 780
20 tacaaccagt tcaggagaga attgaccctc acagtttttg acattgtgtc tctcttcccg 840
aactatgact ccagaaccta ccctatccgt acagtgtccc aacttaccag agaaatctat 900
actaaccag ttcttgagaa cttcgacggt agcttccgtg gttctgcca aggtatcgaa 960
25 ggctccatca ggagcccaca cttgatggac atcttgaaca gcataactat ctacaccgat 1020
gctcacagag gagagtatta ctggtctgga caccagatca tggcctctcc agttggattc 1080
agcggggccg agtttacctt tcctctctat ggaactatgg gaaacgccgc tccacaacaa 1140
cgatcgttg ctcaactagg tcagggtgtc tacagaacct tgtcttccac cttgtacaga 1200
30 agacccttca atatcggtat caacaaccag caactttccg ttcttgacgg aacagagtct 1260
gcctatggaa cctcttctaa cttgccatcc gctgtttaca gaaagagcgg aaccgttgat 1320
tccttgagacg aaatcccacc acagaacaac aatgtgccac ccaggcaagg attctccac 1380
35 aggttgagcc acgtgtccat gttccgttcc ggattcagca acagttccgt gagcatcatc 1440
agagctccta tgttctcatg gattcatcgt agtgctgagt tcaacaatat cattccttcc 1500
tctcaaatac cccaaatccc attgaccaag tctactaacc ttggatctgg aacttctgtc 1560
gtgaaaggac caggcttcac aggaggtgat attccttagaa gaacttctcc tggccagatt 1620
40 agcaccctca gagttaacat cactgcacca ctttctcaaa gatatcgtgt caggattcgt 1680
tacgcatcta ccactaactt gcaattccac acctccatcg acggaaggcc tatcaatcag 1740
ggtaacttct ccgcaaccat gtcaagcggc agcaacttgc aatccggcag cttcagaacc 1800
45 gtcggtttca ctactccttt caacttctct aacggatcaa gcgttttcac ctttagcgct 1860
catgtgttca attctggcaa tgaagtgtac attgaccgta ttgagtttgt gcctgccgaa 1920
gttaccttctg aggttgagta ctgagaattc atgctgatgt ttgtatggat cctgagccca 1980
tagtgcgat cgtaggtcga aatggtctat gtgttgatgt tagggatgga agattccaca 2040
50 acggaaacgc aatacagttg tggccatgca agtctaatac agatgcaaat cagctctgga 2100
ctttgaaaag agacaatact attcgatcta atggaaaagt tttaactact tacgggtaca 2160
gtccgggagt ctatgtgatg atctatgatt gcaatactgc tgcaactgat gccaccgct 2220
ggcaaatatg ggataatgga accatcataa atcccagatc tagtctagtt ttagcagcga 2280
55 catcaggga cagtggatcc acacttacgg tgcaaaccac catttatgcc gttagtcaag 2340
gttggcttcc tactaataat acacaacctt ttgttacaac cattgttggg ctatatggtc 2400
tgtgcttgca agcaaatagt ggacaagtat ggatagagga ctgtagcagt gaaaaggctg 2460
60 aacaacagtg ggctctttat gcagatggtt caatacgtcc tcagcaaac cgagataatt 2520
gccttacaag tgattctaata atacgggaaa cagttgttaa gatcctctct tgtggccctg 2580
catcctctgg ccaacgatgg atgttcaaga atgatggaac cattttaaat ttgtatagt 2640
gattggtgtt agatgtgaag cttgtcgaga agtactagag gatcataatc ag 2692

```

<210> 8

<211> 2436

ES 2 298 140 T3

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de nucleótidos de CryIA(b)-RTB3 en pFASTBAC1

<400> 8

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

```

aaataagtat tttactgttt tcgtaacagt tttgtaataa aaaaacctat aaatatccg 60
gattattcat accgtccac catcgggcgc ggatccatgg acaacaaccc aaacatcaac 120
gaatgcattc catacaactg cttgagtaac ccagaagttg aagtacttgg tggagaacgc 180
attgaaaccg gttacactcc catcgacatc tccttgcct tgacacagtt tctgctcagc 240
gagttcgtgc caggtgctgg gttcgttctc ggactagtgg acatcatctg gggtatcttt 300
ggtccatctc aatgggatgc attcctgggtg caaattgagc agttgatcaa ccagaggatc 360
gaagagttcg ccaggaacca ggccatctct aggttggaag gattgagcaa tctctaccaa 420
atctatgcag agagcttcag agagtgggaa gccgatccta ctaaccagc tctccgcgag 480
gaaatgcgta ttcaattcaa cgacatgaac agcgccttga ccacagctat cccattgttc 540
gcagtccaga actaccaagt tcctctcttg tccgtgtacg ttcaagcagc taatcttcac 600
ctcagcgtgc ttcgagacgt tagcgtgttt gggcaaagggt ggggattcga tgcgtcaacc 660
atcaatagcc gttacaacga ccttactagg ctgattggaa actacaccga ccacgctgtt 720
cgttggtaca aactggctt ggagcgtgtc tggggtcctg attctagaga ttggattaga 780
tacaaccagt tcaggagaga attgaccctc acagttttgg acattgtgtc tctctcccg 840
aactatgact ccagaaccta ccctatccgt acagtgtccc aacttaccag agaaatctat 900
actaaccag ttcttgagaa cttcgacggt agcttccgtg gttctgcca aggtatcgaa 960
ggctccatca ggagcccaca cttgatggac atcttgaaca gcataactat ctacaccgat 1020
gctcacagag gagagtatta ctggtctgga caccagatca tggcctctcc agttggattc 1080
agcggggccg agtttacctt tcctctctat ggaactatgg gaaacgccgc tccacaacaa 1140
cgtatcgttg ctcaactagg tcagggtgtc tacagaacct tgtctccac cttgtacaga 1200
agacccttca atatcggtat caacaaccag caactttccg ttcttgacgg aacagagttc 1260
gcctatggaa cctcttctaa cttgccatcc gctgtttaca gaaagagcgg aaccgttgat 1320
tccttgacg aaatcccacc acagaacaac aatgtgccac ccaggcaagg attctccac 1380
aggttgagcc acgtgtccat gttccgttcc ggattcagca acagttccgt gagcatcatc 1440
agagctccta tgttctcatg gattcatcgt agtgctgagt tcaacaatat cattccttcc 1500
tctcaaatac ccaaataccc attgaccaag tctactaacc ttggatctgg aacttctgtc 1560
gtgaaaggac caggcttcac aggaggtgat attcttagaa gaacttctcc tggccagatt 1620
agcaccctca gagttaacat cactgcacca ctttctcaaa gatatcgtgt caggattcgt 1680
tacgcatcta ccactaactt gcaattccac acctccatcg acggaaggcc tatcaatcag 1740
ggtaacttct ccgcaaccat gtcaagcggc agcaacttgc aatccggcag cttcagaacc 1800
gtcggtttca ctactcctt caacttctct aacggatcaa gcgttttcac ccttagcgct 1860
catgtgttca attctggcaa tgaagtgtac attgaccgta ttgagtttgt gcctgccgaa 1920
gttaccttcg aggctgagta ctgagaattc atgctgatgt ttgtatggat cctgagccca 1980
tagtgcgat cgtaggtcga aatggtctat gtgttgatgt tagggatgga agattccaca 2040
acggaaacgc aatacagttg tggccatgca agtctaatac agatgcaaat cagctctgga 2100
ctttgaaaag agacaatact attcgatcta atggaaagtg ttaactact tacgggtaca 2160
gtccgggagt ctatgtgatg atctatgatt gcaatactgc tgcaactgat gccacccgct 2220
ggcaaatatg ggataatgga accatcataa atcccagatc tagtctagtt ttagcagcga 2280
catcagggaa cagtgtgacc aacttacgg tgcaaaccaa catttatgcc gttagtcaag 2340
gttggttcc tactaataat acacaacctt ttgttacaac cattgttggg ctatatggtc 2400
taagcttgctc gagaagtact agaggatcat aatcag 2436

```

ES 2 298 140 T3

<210> 9

<211> 2788

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de nucleótidos de CryIA(c)-RTB1 en pFASTBAC1

<400> 9

15 **aaataagtat tttactgttt tcgtaacagt tttgtaataa aaaaacctat aaatattccg 60**
 gattattcat accgtccac catcgggcgc ggatccatgg acaacaaccc aaacatcaac 120
 gaatgcattc catacaactg cttgagtaac ccagaagttg aagtacttgg tggagaacgc 180
 attgaaaccg gttacactcc catcgacatc tccttgctct tgacacagtt tctgctcagc 240
 20 **gagttcgtgc caggtgctgg gttcgttctc ggactagttg acatcatctg gggtatcttt 300**
 ggtccatctc aatgggatgc attcctggtg caaattgagc agttgatcaa ccagaggatc 360
 gaagagttcg ccaggaacca ggccatctct aggttggaag gattgagcaa tctctaccaa 420
 atctatgcag agagcttcag agagtgggaa gccgatccta ctaaccagc tctccgcgag 480
 25 **gaaatgcgta ttcaattcaa cgacatgaac agcgcttga ccacagctat ccattgttc 540**
 gcagtccaga actaccaagt tcctctcttg tccgtgtacg ttcaagcagc taatcttcac 600
 ctcagcgtgc ttcgagacgt tagcgtgttt gggcaaaggc ggggattcga tgctgcaacc 660
 30 **atcaatagcc gttacaacga cttactagg ctgattggaa actacaccga ccacgctgtt 720**
 cgttggtaca aactgggctt ggagcgtgtc tggggtcctg attctagaga ttggattaga 780
 tacaaccagt tcaggagaga attgaccctc acagttttgg acattgtgtc tctcttcccg 840
 aactatgact ccagaacctc ccctatccgt acagtgtccc aacttaccag agaaatctat 900

40

45

50

55

60

65

ES 2 298 140 T3

5 actaaccag ttcttgagaa ctctgacggt agcttccgtg gttctgcca aggtatcgaa 960
 ggctccatca ggagccaca cttgatggac atcttgaaca gcataactat ctacaccgat 1020
 gctcacagag gagagtatta ctgggtctgga caccagatca tggcctctcc agttggattc 1080
 agcggggcccg agtttacctt tcctctctat ggaactatgg gaaacgccgc tccacaacaa 1140
 cgtatcggtg ctcaactagg tcaggggtgc tacagaacct tgtcttccac cttgtacaga 1200
 agacccttca atatcggtat caacaaccag caactttccg ttcttgacgg aacagagttc 1260
 10 gcctatggaa cctcttctaa cttgccatcc gctgtttaca gaaagagcgg aaccggtgat 1320
 tccttgagcg aaatcccacc acagaacaac aatgtgccac ccaggcaagg attctcccac 1380
 aggttgagcc acgtgtccat gttccgttcc ggattcagca acagttccgt gagcatcatc 1440
 agagctccta tgttctcttg gatacaccgt agtgctgagt tcaacaacat catcgcatcc 1500
 15 gatagtatta ctcaaattccc tgcagtgaag ggaaactttc tcttcaacgg ttctgtcatt 1560
 tcaggaccag gattcactgg tggagacctc gttagactca acagcagtgg aaataacatt 1620
 cagaatagag ggtatattga agttccaatt cacttcccat ccacatctac cagatataga 1680
 20 gttcgtgtga ggtatgcttc tgtgaccctt attcacctca acgttaattg gggtaattca 1740
 tccatcttct ccaatacagt tccagctaca gctacctctt tggataatct ccaatccagc 1800
 gatttcggtt actttgaaag tgccaatgct tttacatctt cactcggtaa catcgtgggt 1860
 gttagaaact ttagtgggac tgcaggagtg attatcgaca gattcgagtt cattccagtt 1920
 25 actgcaacac tcgaggctga atgagaattc atgctgatgt ttgtatggat cctgagccca 1980
 tagtgcgat cgtaggctga aatggctctat gtgttgatgt tagggatgga agattccaca 2040
 acggaaacgc aatacagttg tggccatgca agtctaatac agatgcaaat cagctctgga 2100
 ctttgaaaag agacaatact attcgatcta atggaaagtg tttactact tacgggtaca 2160
 30 gtccgggagt ctatgtgatg atctatgatt gcaatactgc tgcaactgat gccaccgct 2220
 ggcaaatatg ggataatgga accatcataa atcccagatc tagtctagtt ttagcagcga 2280
 catcagggaa cagtggatcc acacttacgg tgcaaaccaa catttatgcc gttagtcaag 2340
 35 gttggcttcc tactaataat acacaacctt ttgttacaac cattgttggg ctatatgggtc 2400
 tgtgcttgca agcaaatagt ggacaagtat ggatagagga ctgtagcagt gaaaaggctg 2460
 aacaacagtg ggctctttat gcagatgggt caatacgtcc tcagcaaaac cgagataatt 2520
 gccttacaag tgattctaata atacgggaaa cagttgttaa gatcctctct tgtggccctg 2580
 40 catcctctgg ccaacgatgg atgttcaaga atgatggaac cattttaaat ttgtatagtg 2640
 gattgggtgt agatgtgagg cgatcggatc cgagccttaa acaaatcatt ctttaccctc 2700
 tccatggtga cccaaaccaa atatggttac cattattttg atagacagat tacaagcttg 2760
 45 tcgagaagta ctagaggatc ataatacag 2788

<210> 10

<211> 2692

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de nucleótidos de CryIA(c)-RTB2 en pFASTBAC1

ES 2 298 140 T3

<400> 10

```

aaataagtat tttactgttt tcgtaacagt tttgtaataa aaaaacctat aaatattccg 60
5   gattattcat accgtccac catcgggcgc ggatccatgg acaacaaccc aaacatcaac 120
    gaatgcattc catacaactg cttgagtaac ccagaagttg aagtacttgg tggagaacgc 180
    attgaaaccg gttacactcc catcgacatc tccttgtcct tgacacagtt tctgctcagc 240
    gagttcgtgc caggtgctgg gttcgttctc ggactagtgtg acatcatctg ggggtatctt 300
10  ggtccatctc aatgggatgc attcctgggtg caaattgagc agttgatcaa ccagaggatc 360
    gaagagttcg ccaggaacca ggccatctct aggttggaag gattgagcaa tctctacca 420
    atctatgcag agagcttcag agagtgggaa gccgatccta ctaaccagc tctccgcgag 480
    gaaatgcgta ttcaattcaa cgacatgaac agcgccttga ccacagctat ccattgttc 540
15  gcagtccaga actaccaagt tcctctcttg tccgtgtacg ttcaagcagc taatcttcac 600
    ctcagcgtgc ttcgagacgt tagcgtgttt gggcaaaggt ggggattcga tgctgcaacc 660
    atcaatagcc gttacaacga cttactagg ctgattggaa actacaccga ccacgctgtt 720
    cgttgggtaca acactggctt ggagcgtgtc tggggtcctg attctagaga ttggattaga 780
20  tacaaccagt tcaggagaga attgaccctc acagttttgg acattgtgtc tctcttccc 840
    aactatgact ccagaacctc ccctatccgt acagtgtccc aacttaccag agaatctat 900
    actaaccag ttcttgagaa cttcgacggt agcttccgtg gttctgcca aggtatcgaa 960
    ggctccatca ggagcccaca cttgatggac atcttgaaca gcataactat ctacaccgat 1020
25  gctcacagag gagagtatta ctggtctgga caccagatca tggcctctcc agttggattc 1080
    agcgggcccg agtttacctt tcctctctat ggaactatgg gaaacgccgc tccacaacaa 1140
    cgtatcgttg ctcaactagg tcaggggtgc tacagaacct tgtcttccac cttgtacaga 1200
    agacccttca atatcggtat caacaaccag caactttccg ttcttgacgg aacagagttc 1260
30  gcctatggaa cctcttctaa cttgccatcc gctgtttaca gaaagagcgg aaccgttgat 1320
    tccttggacg aaatcccacc acagaacaac aatgtgccac ccaggcaagg attctcccac 1380
    aggttgagcc acgtgtccat gttccgttcc ggattcagca acagttccgt gagcatcatc 1440
    agagctccta tgttctcttg gatacaccgt agtgctgagt tcaacaacat catcgcatcc 1500
35  gatagtatta ctcaaatccc tgcagtgaag ggaaacttct tcttcaacgg ttctgtcatt 1560
    tcaggaccag gattcactgg tggagacctc gttagactca acagcagtgg aaataacatt 1620
    cagaatagag ggtatattga agttccaatt cacttcccat ccacatctac cagatataga 1680
    gttcgtgtga ggtatgcttc tgtgacctc attcacctca acgttaattg gggtaatca 1740
40  tccatcttct ccaatacagt tccagctaca gctacctct tggataatct ccaatccagc 1800
    gatttcggtt actttgaaag tgccaatgct tttacatctt cactcggtaa catcgtgggt 1860
    gttagaaact ttagtgggac tgcaggagtg attatcgaca gattcgagtt cattccagtt 1920
    actgcaacac tcgaggctga atgagaattc atgctgatgt ttgtatggat cctgagccca 1980
45  tagtgctgat cgtaggtcga aatgggtctat gtgtgatgt tagggatgga agattccaca 2040
    acggaaacgc aatacagttg tggccatgca agtctaatac agatgcaaat cagctctgga 2100
    ctttgaaaag agacaatact attcgatcta atggaaagtg tttactact tacgggtaca 2160
    gtccgggagt ctatgtgatg atctatgatt gcaatactgc tgcaactgat gccaccgcgt 2220
50  ggcaaatatg ggataatgga accatcataa atcccagatc tagtctagtt ttagcagcga 2280
    catcagggaa cagtgtgacc aacttacgg tgcaaaccaa catttatgcc gttagtcaag 2340
    gttggcttcc tactaataat acacaacctt ttgttacaac cattgttggg ctatatggtc 2400
    tgtgcttgca agcaaatagt ggacaagtat ggatagagga ctgtagcagt gaaaaggctg 2460
55  aacaacagtg ggctctttat gcagatggtt caatacgtcc tcagcaaac cgagataatt 2520
    gccttacaag tgattctaata atacgggaaa cagttgttaa gatcctctct tgtggccctg 2580
    catcctctgg ccaacgatgg atgttcaaga atgatggaac cattttaaat ttgtatagtg 2640
    gattggtggt agatgtgaag cttgtcgaga agtactagag gatcataatc ag 2692

```

<210> 11

<211> 2436

<212> ADN

65 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 298 140 T3

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de nucleótidos de CryIA(c)-RTB3 en pFASTBAC1

<400> 11

```

5      aaataagtat tttactgttt tcgtaacagt tttgtaataa aaaaacctat aaatattccg 60
      gattattcat accgtcccac catcgggcgc ggatccatgg acaacaaccc aaacatcaac 120
      gaatgcattc catacaactg cttgagtaac ccagaagttg aagtacttgg tggagaacgc 180
      attgaaaccg gttacactcc catcgacatc tccttgctct tgacacagtt tctgctcage 240
10     gagttcgtgc caggtgctgg gttcgttctc ggactagttg acatcatctg gggatatctt 300
      ggtccatctc aatgggatgc attcctgggtg caaattgagc agttgatcaa ccagaggatc 360
      gaagagttcg ccaggaacca ggccatctct aggttggaag gattgagcaa tctctaccaa 420
      atctatgcag agagcttcag agagtgggaa gccgatccta ctaaccacgc tctccgcgag 480
15     gaaatgcgta ttcaattcaa cgacatgaac agcgccctga ccacagctat cccattgttc 540
      gcagtcacga actaccaagt tcctctcttg tccgtgtacg ttcaagcagc taatcttcac 600
      ctcagcgtgc ttcgagacgt tagcgtgttt gggcaaaggt ggggattcga tgctgcaacc 660
      atcaatagcc gttacaacga ccttactagg ctgattggaa actacaccga ccacgctgtt 720
20     cgttgggtaca acactggctt ggagcgtgtc tggggtcctg attctagaga ttggattaga 780
      tacaaccagt tcaggagaga attgaccctc acagttttgg acattgtgtc tctcttcccg 840
      aactatgact ccagaacctc cctatccgtg acagtgtccc aacttaccag agaaatctat 900
      actaaccacg ttcttgagaa cttcgacggg agcttccgtg gttctgccc aaggtatcga 960
25     ggctccatca ggagcccaca cttgatggac atcttgaaca gcataactat ctacaccgat 1020
      gctcacagag gagagtatta ctggtctgga caccagatca tggcctctcc agttggattc 1080
      agcgggcccc agtttacctt tcctctctat ggaactatgg gaaacgccgc tccacaacaa 1140
      cgtatcgttg ctcaactagg tcagggtgtc tacagaacct tgtcttccac cttgtacaga 1200
30     agacccttca atatcggtat caacaaccag caactttccg ttcttgacgg aacagagttc 1260
      gcctatggaa cctcttctaa cttgccatcc gctgtttaca gaaagagcgg aaccgttgat 1320
      tccttgagcg aaatcccacc acagaacaac aatgtgccac ccaggcaagg attctcccac 1380
      aggttgagcc acgtgtccat gttccgttcc ggattcagca acagttccgt gagcatcatc 1440
35     agagctccta tgttctcttg gatacacctg agtgctgagt tcaacaacat catcgcatcc 1500
      gatagtatta ctcaaattcc tgcagtgaag ggaaactttc tcttcaacgg ttctgtcatt 1560
      tcaggaccag gattcactgg tggagacctc gttagactca acagcagtgg aaataacatt 1620
      cagaatagag ggtatattga agttccaatt cacttcccat ccacatctac cagatataga 1680
40     gttcgtgtga ggtatgcttc tgtgacctc attcacctca acgttaattg gggtaatca 1740
      tccatcttct ccaatacagt tccagctaca gctacctcct tggataatct ccaatccagc 1800
      gatttcgggtt actttgaaag tgccaatgct ttacatctt cactcggtaa catcgtgggt 1860
      gttagaaact ttagtgggac tgcaggagtg attatcgaca gattcgagtt cattccagtt 1920
45     actgcaacac tcgaggtcga atgagaattc atgctgatgt ttgtatggat cctgagccca 1980
      tagtgctgat cgtaggtcga aatgggtctat gtgttgatgt tagggatgga agattccaca 2040
      acggaacgcg aatacagttg tggccatgca agtctaatac agatgcaaat cagctctgga 2100
      ctttgaasag agacaatact attcgatcta atggaaagtg ttaactact tacgggtaca 2160
50     gtccgggagt ctatgtgatg atctatgatt gcaatactgc tgcaactgat gccacccgct 2220
      ggcaaatatg ggataatgga accatcataa atcccagatc tagtctagtt ttagcagcga 2280
      catcagggaa cagtgtgacc acacttacgg tgcaaaccaa catttatgcc gttagtcaag 2340
      gttggcttcc tactaataat acacaacctt ttgttacaac cattgttggg ctatatgggtc 2400
55     taagcttgtc gagaagtact agaggatcat aatcag                                     2436

```

<210> 12

<211> 26

60

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

65

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador

ES 2 298 140 T3

	<400> 12	
	caacaacaaa ggaattcatg ctgatg	26
5	<210> 13	
	<211> 27	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador	
15	<400> 13	
	ggacacacac actgcaagct tgtaatc	27
20	<210> 14	
	<211> 27	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador	
30	<400> 14	
	cggatccgaa agcttcacat ctaacac	27
35	<210> 15	
	<211> 26	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador	
45	<400> 15	
	gcttgcaagc ttagaccata tagccc	26
50	<210> 16	
	<211> 25	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador	
60	<400> 16	
	cgcaattgaaa ccggttacac tcca	25
65	<210> 17	
	<211> 25	

ES 2 298 140 T3

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador

<400> 17

10

cttgggcaga accacggaag ctacc

25

<210> 18

15 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador

<400> 18

25

gatgtttgta tggatcctca gccca

25

<210> 19

30 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador

<400> 19

40

gccgaacaat ggttgaaca aaagg

25

45

50

55

60

65